



EESTI MAAÜLIKOOL

Tehnikainstituut

**Siim Muiste**

**ULTRAHELI MEETODIL LIPOSOOMSE  
MIKROKAPSULEERIMISE SEADME TEHNILINE  
LAHENDUS**

**TECHNICAL SOLUTION OF ULTRASONIC DEVICE FOR  
LIPOSOMAL MICRO-ENCAPSULATION**

Magistritöö

Energiakasutuse õppekava

Juhendajad: dotsent Eugen Kokin, *DSc*

nooremteadur Andres Sats, *MSc*

Tartu 2019

Eesti Maaülikool		Magistritöö lühikokkuvõte	
Kreutzwaldi 1, Tartu 51014			
Autor: Siim Muiste		Õppekava: Energiakasutus	
Pealkiri: Ultraheli meetodil liposoomse mikrokapsuleerimise seadme tehniline lahendus			
Lehekülgi: 56	Jooniseid: 39	Tabeleid: 10	Lisasid: –
Osakond / Õppetool: Energiakasutuse õppetool ETIS-e teadusvaldkond ja CERC S-i kood: 4. Loodusteadused ja tehnika  4.17 Energeetikaalased uuringud  T140 Energeetika Juhendajad: Eugen Kokin, <i>DSc</i> ; Andres Sats, <i>MSc</i>  Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu, 2019			
<p>Liposoomide kasutamise juures on üheks olulisemaks karakteristikuks nende läbimõõt. Vajalik läbimõõt sõltub eelkõige liposoomide kasutusvaldkonnast. Ultrahelitöötlus on väikeseläbimõõduliste liposoomide valmistamiseks üks kõige enam kasutatavaid meetodeid. Tööstuslike ultrahelitöötuse seadmete kaasabil ultraheli otsese rakendamise meetodil on liposoomide tekkimise dünaamikat kirjeldatud mitmetes varasemates teadusuuringutes. Samas (käesoleva töö autorile teadaolevalt) ei ole kajastust leidnud kaudse ultrahelitöötuse meetodi rakendamise põhjalikumad uuringud. Töö eesmärgiks on luua tehniline lahendus erineva sageduse ja amplituudiga ultrahelitöötuse rakendamiseks letsitiini lahusele, et tekitada võimalikult väikese läbimõõduga stabiilseid liposoomide ning töötlemisega kaasneva energiakulu määramine. Töö kirjutamisel on tuginetud kirjandusallikatele ja teaduspublikatsioonidele ning töö läbiviimise käigus kogutud andmeid on võrreldud varasemate läbiviidud uurimustega. Seadme juhtimiseks on koostatud vajalik tehniline lahendus ning kontrollitud selle toimimist. Andmete statistilise olulisuse selgitamiseks ja hüpoteeside kontrollimiseks kasutati t-testi. Töö tulemusel on jõutud järeldusele, et kaudse töötlemisviisi efektiivsus on sarnane tööstuslike seadmete abil läbiviidud otsese töötlemise käigus saadud tulemustega. Seadme juhtimiseks koostatud tehniline lahendus on toimiv ning võimaldab jätkata uuringutega liposoomide valmistamismeetodi tõhusamaks muutmiseks. Samuti on leitud seos lahuse kontsentratsiooni ja ultrahelitöötuse mõju vahel.</p>			
Märksõnad: Ultrahelitöötlus, mikrokapsuleerimine, liposoomid, piesokeraamika, letsitiin.			

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Master's Thesis	
Author: Siim Muiste		Curriculum: Energy Application Engineering	
Title: Technical Solution of Ultrasonic Device for Liposomal Micro-Encapsulation			
Pages: 56	Figures: 39	Tables: 10	Appendixes: –
Department / Chair: Chair of Energy Application Engineering Field of research and (CERC S) code: 4. Natural Sciences and Engineering 4.17. Energetic Research T140 Energy research Supervisors: Eugen Kokin, <i>DSc</i> ; Andres Sats, <i>MSc</i> Place and date: Tartu, 2019			
<p>Application for usage of liposomes is largely dependent on the size of the liposomes. Sonication is widely used method for liposome size reduction. Various studies on the dynamics of liposome formation have been carried out with methods of direct sonication. Indirect sonication methods have not been examined enough. The aim of thesis is to develop a technical solution for the application of sonication with different frequencies and amplitudes and to study the effect of this on the process on liposome formation in lecithin solution and determination of the energy consumption associated with the treatment. Author has examined different sources of literature and scientific articles to describe and analyze methods for liposome production, size reduction and the effects of sonication. Data collected during the work were compared with previous works. Technical solution for operating conditions of the device has been constructed and several tests has been conducted. A statistical analyzes (student t-test) has been performed to test statistical significance of experiment results. It has been concluded that the effectiveness of the indirect treatment is comparable to that obtained by direct processing. The technical solution for controlling the device is workable and allows further research to make the method of producing liposomes more efficient. A relationship between solution concentration and sonication effect has also been found.</p>			
Keywords: Ultrasound processing, Micro-Encapsulation, Liposomes, Piezoceramics, Lecithin.			

## SISUKORD

<b>TÄHISED JA LÜHENDID .....</b>	<b>5</b>
<b>SISSEJUHATUS .....</b>	<b>6</b>
<b>1. KIRJANDUSE ANALÜÜS.....</b>	<b>8</b>
1.1. Liposoomide ehitus .....	8
1.2. Liposoomide valmistamine .....	10
1.3. Ultrahelitöötuse mõju liposoomide suurusele .....	12
1.4. Liposoomide rakendamise võimalused .....	13
1.5. Piesoelement.....	14
<b>2. MATERJAL JA METOODIKA .....</b>	<b>16</b>
2.1. Kasutatav seade .....	16
2.2. Seadme elektrooniline skeem .....	17
2.3. Seadme juhtimiseks koostatud elektriline skeem .....	19
2.4. Seadme juhtimise skeemi komponendid .....	20
2.5. Sooritatud katsed .....	24
2.5.1. Ettevalmistused katseteks .....	24
2.5.2. Katsete läbiviimine.....	26
2.5.3. Temperatuurikatse .....	27
2.5.4. Võimsuse mõõtmise katse .....	28
2.6. Liposoomide suurusjaotuse määramine .....	30
2.6.1. Osakeste suurusjaotus mikromeetri skaalas .....	30
2.6.2. Osakeste suurusjaotus nanomeetri skaalas .....	31
2.7. Andmete statistiline töötlus .....	34
<b>3. TULEMUSED JA ANALÜÜS.....</b>	<b>36</b>
3.1. Temperatuurikatse .....	36
3.2. Osakeste suurus mikromeetri skaalas .....	37
3.3. Osakeste suurus nanomeetri skaalas.....	40
3.4. Liposoomide stabiilsus säilitamisel.....	42
3.5. Ultrahelitöötuse kestuse mõju hindamine osakeste suurusele.....	45
3.6. Võimsuse mõõtmise katse ja energiakulu arvestus .....	47
<b>KOKKUVÕTE .....</b>	<b>51</b>
<b>KIRJANDUS.....</b>	<b>53</b>
<b>LIHTLITSENTS .....</b>	<b>56</b>

## TÄHISED JA LÜHENDID

DLS	– <i>Dynamic Light Scattering</i> , Dünaamiline valgushajumine
$E_1$	– Elektrienergia kulu vattmeetriga leitud piesoelemendi võimsuse korral
$E_2$	– Elektrienergia kulu arvutuslikult leitud piesoelemendi võimsuse korral
$E_s$	– Elektrienergia kulu ühes sekundis
$f_a$	– antiresonants-sagedus
$f_r$	– resonants-sagedus
GUV	– <i>Giant Unilammelar Vesicles</i>
LCR	– induktiivsuse-mahtuvuse-takistus multimeeter
LUV	– <i>Large Unilamellar Vesicles</i>
MLV	– <i>Multilamellar Vesicle</i>
MMV	– <i>Multivesicular vesicles</i>
MUV	– <i>Medium sized Unilamellar Vesicles</i>
OLV	– <i>Oligolamellar vesicles</i>
OSC CH1	– ostsilloskoobi esimene kanal
OSC CH2	– ostsilloskoobi teine kanal
$P_2$	– arvutuslik seadme hetkeline võimsus
PZT1	– plii-tsirkonaat-titanaat piesoelement
R1	– takisti võimsuse mõõtmise ahelas
SUV	– <i>Small Unilamellar Vesicles</i>
UV	– <i>Unilamellar Vesicles</i>

## SISSEJUHATUS

Lipiidid ehk üldisemalt tuntud kui rasv ja rasvained on oluliseks osaks kõikide toidusedelis olles oluliseks igapäevaseks energiaallikaks. Liposoomid on fosfolipiididest kunstlikult valmistatud mikroskoopilised kapslid, mis oma ehituselt sarnanevad inimrakule. Liposoomide struktuur võimaldab erinevate ainete või ühendite kapseldamise liposoomide sisemusse ning kaitsta neid väliskeskkonna kahjulike mõjude eest. Seetõttu on liposoomide võimalik kasutada erinevate ainete ja ühendite transportimiseks inimorganismi rakutasandil.

Lipiidid on vesilahustes ka spontaanselt võimelised moodustama erineva struktuuri ning läbimõõduga liposoomide. Stabiilsema struktuuri ning suurema sisemise mahutavuse saavutamiseks on üheks kriitiliseks parameetrik liposoomide juures nende suurus. Spontaanselt moodustuvad pigem suuremamõõdulised ning ebastabiilsemad liposoomid ning seetõttu on vajalik kunstlikult nende läbimõõdu vähendada. Liposoomide läbimõõdu vähendamise meetodeid on mitmesugustest töötlemis- ja valmistamisviisidest lähtuvalt erinevaid. Ultrahelitöötlus on üheks enamlevinud liposoomide läbimõõdu vähendamise meetodiks.

Kuigi liposoomide valmistamise, uurimise, töötlemise ja uute rakendamisevõimaluste väljaselgitamisega on tegeletud liposoomide avastamise algusaegadest 1960-ndatest aastatest alates on antud valdkonnas veel piisavalt palju uurimissuundasid ning -valdkondi, mis on seniste uuringutega katmata. Käesoleva lõputöö eesmärgiks on tehnilise lahenduse leidmine erineva sageduse ja amplituudiga ultrahelitöötluse ja selle rakendamise kestvuse mõju uurimine liposoomide tekkimise protsessile letsitiini lahuses, liposoomide suurusele ning sellega kaasneva energiakulu määramine. Omaette eesmärgiks tehnilise lahenduse väljatöötamisel on selleks võimalikult soodsa seadme kasutamine ning sellele erinevate sageduse, amplituudi ja ajalise kasutamise funktsionaalsuse lisamine.

Seatud eesmärkide saavutamiseks tuleb kõigepealt tutvuda olemasoleva seadme juhtimise ja töötamise põhimõtetega. Seejärel püüda välja selgitada võimalused selle juhtimisskeemi modifitseerimiseks ning koostada uus juhtimisskeem erineva sageduse ning amplituudiga ultrahelisignaali rakendamiseks. Töötava skeemi koostamise järel tuleb olemasoleva seadme ja

koostatud juhtimisskeemi tööd kontrollida erinevate katsete läbi ning seejärel analüüsida saadud tulemusi.

Töö jaguneb kolmeks peatükiks. Esimeses peatükis antakse erinevatele teadusartiklitele ning kirjandusallikatele tuginedes ülevaade liposoomidest, nende valmistamise viisidest, tekkemehhanismidest ning olulisusest erinevates elu- ja uurimisvaldkondades. Samuti kirjeldatakse esimeses peatükis ultrahelitöötluks vajaliku piesokristallist elemendi töötamise põhimõtteid ning valiku võimalusi. Teises peatükis kirjeldatakse ultrahelitöötluks valitud seadet ning selle juhtimisskeemi modifitseerimist, katsete läbiviimise metoodikat, kasutatud aparatuuri ning vahendeid. Kolmandas peatükis analüüsitakse katseandmeid ning esitatakse töö tulemused.

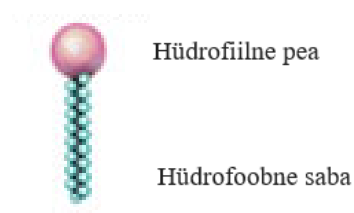
Katsete läbiviimine on teostatud Eesti Maaülikooli tehnikamaja laboratooriumis ning katsete käigus kogutud proovide analüüs Eesti Maaülikooli toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia õppetooli laborikompleksis. Saadud tulemuste analüüsimiseks on teostatud andmete statistiline töötlemine ning arvutuslikult kontrollitud nende vastavust seatud hüpoteesidele.

Olemasolevale kirjandusele tuginedes võib väita, et ultrahelitöötluks kasutatakse enamasti tööstuslikke seadmeid ning ultraheli rakendamiseks lahusele vedeliku sisse uputatavaid sonde (ultraheli rakendamise otsene meetod), mille kasutamisel on paraku mitmeid negatiivseid külgi. Käesolev töö püüab leida lahenduse ultraheli rakendamise kaudse meetodi (lahuse töötlemine ultraheli sagedusel vibreerivas mahutis) efektiivistamiseks jaekaubandusest kättesaadava seadme abil. Töö tulemusel on võimalik jätkata edasiste uuringute ja katsetustega käesoleva seadme helisageduspiirkonnast väljaspool asuvate sagedustega ultrahelitöötluks mõju analüüsimiseks ning selle rakendamiseks, pakkudes välja kasutamiseks välise, seadmest sõltumatu juhtimisskeemi.

# 1. KIRJANDUSE ANALÜÜS

## 1.1. Liposoomide ehitus

Liposoomid on sfäärilise kujuga väikesed kunstlikud vesiikulid mida on võimalik luua looduslikest fosfolipiididest [1]. Liposoom on mikroskoopiline kapsel, mis võib koosneda ühest või rohkemast kontsentrisest lipiidide kaksikkihist [2]. Liposoomi moodustavad orgaanilised ühendid, lipiidid, on enamasti vees mittelahustuvad erinevate rasvhapete ühendid [2]. Lipiidide molekulid koosnevad alkoholist ja rasvhapete jääkidest, s.o. lipiidid on vähemalt kahekomponendilised estrid [3]. Lipiid koosneb hüdrofiilsest pea ning hüdrofoobsest sabaosast [2]. Enamasti kahest rasvhappe jäägist koosneva mittepolaarne sabaosa võib olla erineva pikkusega ja tavaliselt koosneb sabaosa 14 kuni 24 süsiniku aatomist [4]. Fosfolipiid on kujutatud joonisel 1.1.



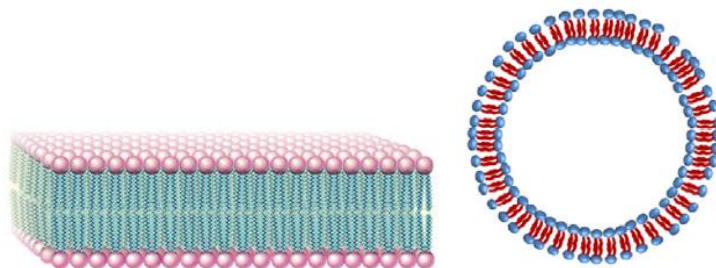
**Joonis 1.1.** Fosfolipiid. [4]

Fosfolipiidide molekuli struktuurist tuleneb üks väga oluline omadus: sellega seotud valguühend (aminohape) on tugevalt veelembene ehk hüdrofiilne, rasvhapetest moodustuv osa aga rasvalembeline ehk lipofiilne. Selliseid kahe antagonistliku (teineteist tõrjuva) keskkonna suhtes tolerantseid aineid nimetatakse amfiifilseteks või difiilseteks. Difiilsusest tingituna mõjutavad fosfolipiidid ainete pindaktiivseid omadusi. See võimaldab nende paigutumist vahekihtidena rasva- ja veefaasi piirpinnale, mis aitab moodustada rasvainetest püsivaid emulsioone veekeskkonnas ja vastupidi. Toiduainete tehnoloogias hinnatakse neid, lisaks emulgeerivatele omadustele, ka toodete veesiduvust parandava võime tõttu. [5, 6]

Fosfolipiididel on elusorganismides eluline tähtsus, kuna nees kuuluvad rakumembraani koostisse ja osalevad nende kaudu toimuvates ainevahetuslikes protsessides. Lisaks omistatakse neile tervistavat toimet, näiteks immuunsüsteemi ja südame tugevdajatenä. [6]

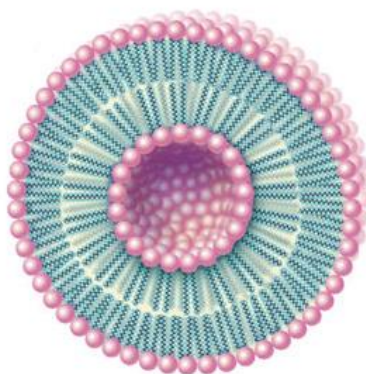


Oma kuju ja amfiifilse omaduse tõttu moodustavad lipiidid vesilahustes spontaanselt kaksikkihilisi struktuure, kus hüdrofiilsed osad on pööratud väljapoole vee osakeste suunas ja hüdrofoobsed osad on pööratud sissepoole, kus nad on vee osakeste eest kaitstud [4]. Lipiidne kaksikkiht on esitatud joonisel 1.2.



**Joonis 1.2.** Lipiidne kaksikkiht. [3, 5]

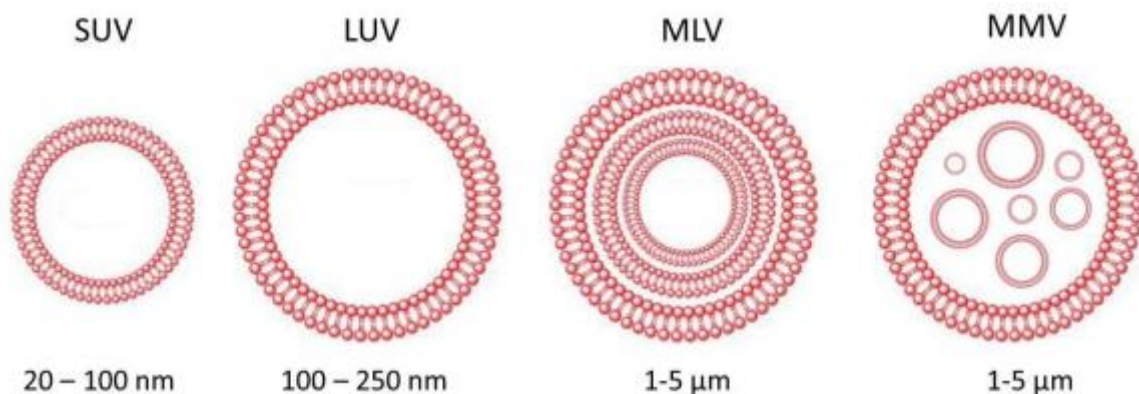
Lipiidsest kaksikkihist moodustuvad vesilahustes sfäärilised põiekesed – liposoomid. Liposoom on kujutatud joonisel 1.3. Liposoomide läbimõõt sõltub nende valmistamisviisist ja valmistamiseks kasutatud lipiididest ning võib ulatuda kuni 5 mikromeetrini [8]. Tänu lipiidsele kaksikkihile on liposoomi sisemus eraldatud liposoomi ümbritsevast väliskeskkonnast muutes liposoomi vees lahustumatuks ning kaitstes liposoomi sisse kapseldunud molekule.



**Joonis 1.3.** Liposoom. [3]

Liposoome tähistatakse ja jaotatakse erinevalt. Läbimõõdu järgi jaotatakse liposoomid väikesteks (*SUV - Small Unilamellar Vesicles* – 20-100 nm), keskmise suurusega (*MUV – Medium sized Unilamellar Vesicles*), suurteks (*LUV – Large Unilamellar Vesicles* >100 nm) ja ülisuurteks (*GUV – Giant Unilammelar Vesicles* >1µm). Struktuuri järgi tuntakse ühe lipiidse

kaksikkihiga kaetud liposoom (UV – *Unilamellar Vesicles*), mitme kontsentrilise lipiidse kaksikkihiga kaetud liposoom (MLV – *Multilamellar Vesicle*) ning struktuure, kus ühe suurema lipiidse kaksikkihi sees võib paikneda mitmeid väiksemaid liposoom (OLV – *Oligolamellar vesicles*, MMV – *Multivesicular vesicles*). [2] Näited liposoomide erinevate struktuuride ja suuruste osas on esitatud joonisel 1.4.



**Joonis 1.4.** Liposoomide jagunemine struktuuri ja suuruse põhjal. [9]

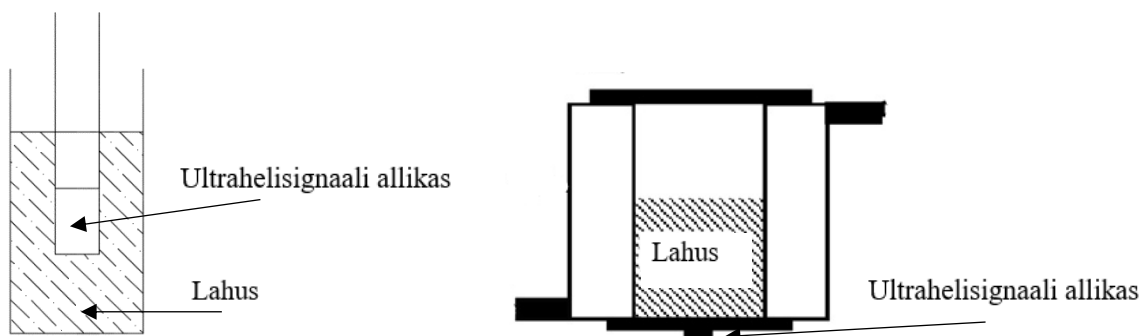
Liposoomide valmistamisel on oluliseks parameetriks nende suurus. Liposoomide läbimõõt mängib suurt rolli erinevates kvantitatiivsetes biofüüsikalistes uuringutes, ravimiuuringutes ning mitmetes teistes rakendustes meditsiini ning bioloogia valdkonnas. [10] Samuti on oluline nende struktuur, sest väiksemad, ühe lipiidse kaksikkihiga kaetud liposoomid on võrreldes suurte ja mitme kaksikkihiga ümbritsetud liposoomidest oluliselt stabiilsemad ning suurema sisemise kapseldamise mahutavusega [11].

## 1.2. Liposoomide valmistamine

Liposoomide valmistamismeetodeid on erinevaid. Tuntakse mitmeid keemilisi ja mehaanilisi meetodeid (näiteks ekstrusioon membraani abil, ultrahelitöötlus, külmutamine, dialüüs, kolonnkromatograafia, injektsioonimeetod) [2]. Ultrahelitöötlus on üks populaarsemaid meetodeid liposoomide valmistamiseks fosfolipiidide vesilahustes ning seda meetodit on kasutatud liposoomide uurimise algusaegadest 1960-ndatest [12].

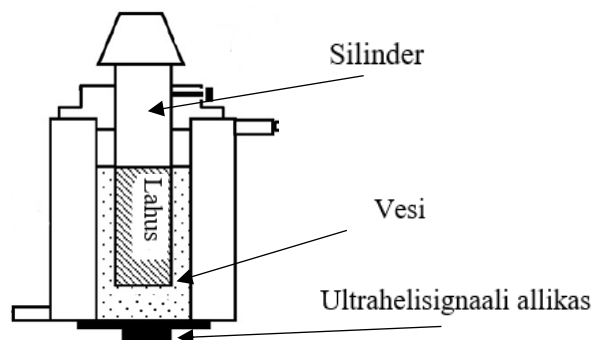
Väikese läbimõõduga liposoomide (SUV) valmistamiseks on ultrahelitöötlus kõige laialdasemalt kasutatud meetodiks. Ultrahelitöötlust fosfolipiidsele lahusele on võimalik rakendada kahel erineval viisil. Otsese töötuse viisiks on ultraheli sagedusel vibreeriva sondi

viimine töödeldava lahuse sisse (joonis 1.5. vasakul) ning kaudse töötuse viisiks on töödeldava lahuse asetamine ultraheli sagedusel vibreeriva seadme mahutisse (joonis 1.5. paremal). [12]



**Joonis 1.5.** Lahuse töötlemine ultrahelivannis. [12]

Mõlemal meetodil on omad eelised ja omad puudused. Sondi kasutamisel on suur oht lahuse temperatuuri kiirele tõusule ning sondi valmistamisel kasutatud metallist võib suure ultraheli tugevuse juures eralduda osakesi, mis võivad sattuda lahusesse ja seeläbi selle rikkuda [2]. Vanni kasutamise eelisteks on meetodi kasutamise lihtsus, kergemini kontrollitavad temperatuuri muutused ning võimalus fosfolipiidne lahus eraldada ümbritsevast keskkonnast asetades see näiteks silindri abil veega täidetud ultrahelivanni (joonis 1.6.) [2]. Vanni kasutamise puudusteks on madalam tootlikkus liposoomide valmistamiseks ning erineva suurusega liposoomide esinemine lahuses (*SUV* ja *MLV*) [2].

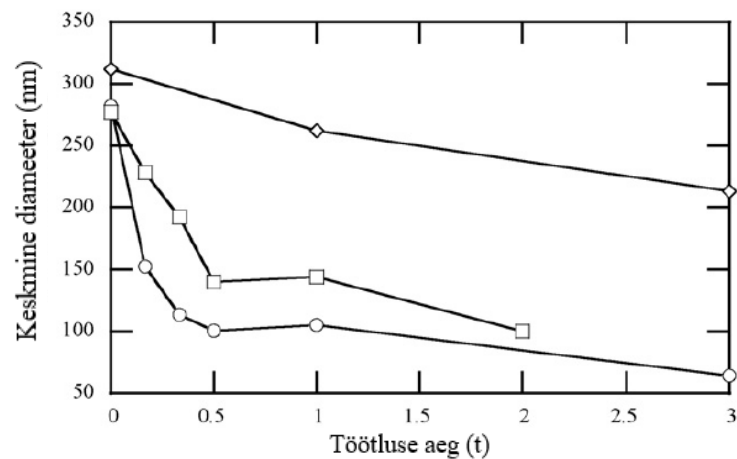


**Joonis 1.6.** Lahuse asetamine ultrahelivanni silindri abil. [12]

Peamisteks liposoomide teket (sh suurust) mõjutavateks parameetriteks on ultrahelisignaali tugevus ja ultrahelitöötuse ajaline kestus [13]. Nende kahe parameetri kontrollimine jätab siiski palju ruumi ka teiste parameetrite mõju uurimiseks nagu ultrahelisignaali sagedus ning ultrahelisignaali allika asetus töödeldava vedeliku suhtes ning kõigi nende oluliste parameetrite omavahelise kombineerimise võimalustele [13].

### 1.3. Ultrahelitöötuse mõju liposoomide suurusele

Ultrahelisignaali sagedus ja amplituud on olulised parameetrid ultrahelitöötuse juures. Arusaam, kuidas need parameetrid mõjutavad liposoomi võib avada võimaluse liposoomide läbimõõdu kontrollimiseks nende parameetrite kontrollimise kaudu. Madalama sagedusega ultraheli võib vähendada liposoomi suurust kiiremini, kui kõrgema sagedusega ultraheli. Lühiajaline töötus tugevama ultrahelisignaali on andnud paremaid tulemusi liposoomide suuruse vähendamisele, kui pikaajalisem töötus nõrgema ultrahelisignaali. [12] Erineva sagedusega ultrahelisignaali läbiviidud katsete tulemused uurimaks selle mõju liposoomide suurusele on esitatud joonisel 1.7.



**Joonis 1.7.** Liposoomide keskmise läbimõõdu vähenemine erineva sagedusega ultraheli-töötusel (ringidega tähistatud – 43 kHz, ruutudega – 133 kHz ja rombidega 480 kHz). [12]

Peamiseks põhjuseks liposoomide läbimõõdu vähenemisel ultrahelitöötuse käigus on ultraheli rakendamisel vedelikule selles tekkival kavitatsiooniefektil. Akustiline kavitatsioon on vedelikus gaasimullide kokkutõmbumine ja paisumine ultrahelilainete toimel. Ultrahelisignaali sagedus on kriitiliseks parameetriks kavitatsiooniefekti tekkimiseks. Vedelikus tekkiva kavitatsioonimulli võnkumise amplituud on madalal sagedusel suurem, kui kõrgemal sagedusel. Seetõttu on madalamal sagedusel liposoomi mõjutav impulsiivne surve löök tugevam, aidates sellega intensiivsemalt kaasa liposoomide suuruse vähenemisele nende struktuuri lõhkumise teel. Seevastu kõrgemal sagedusel on lühema helilaine pikkuse ning ajalise tekkimise tõttu tekkivate kavitatsioonimullide hulk suurem. Seega madalamal sagedusel mõjutatakse liposoomi suurema jõuga vähemal arvil kordadega ning kõrgemal sagedusel suuremal arvil kordadega kuid väiksema jõuga. [10, 12, 13]

#### **1.4. Liposoomide rakendamise võimalused**

Liposoomid on oma ehituselt inimraku ülesehitusele väga sarnased. Liposoomi ja inimraku kokkupuutel tekkiv side võimaldabki liposoomi kapseldunud ühendite inimraku transportimise [14]. Tänu sellele leiavad liposoomid rakendamist mitmetes erinevates valdkondades. Liposoomide peamiseks kasutusvaldkondadeks on meditsiinitööstus, toiduainetööstus ja kosmeetikatööstus [2].

Meditsiinitööstus kasutab liposoomi peamiselt ravimite ning erinevate haiguste uuringutes kasutatavate markerite transpordiks inimeste ning loomade organismi. Liposoomide kaksikkiht aitab kaitsta sellesse kapseldunud ravimeid või markereid väliskeskkonna mõjutuste eest. Liposoomide sisemusse on võimalik paigutada hüdrofiilseid ühendeid ja liposoomi ümbritsevasse kaksikkihti lipofiilseid ühendeid. Selliselt on kasulikud ühendid kaitstud ning tagatud nende jõudmine organismi rakutasandil. Liposoomide abil organismi viidud ravimite puhul on ravimi omastatavus võrreldes tavapäraste manustamisviisidega (tabletid, pulbrid, vedelikud) oluliselt suurem. Haigustekitajate (erinevad vähkkasvajad) uurimisel viiakse liposoomide abil haigestunud kudedesse markereid, mis on hiljem tuvastatavad magnetresonantstomograafia abil ning võimaldavad sedasi jälgida haiguse kulgu ning nakatunud rakkusid. Samuti on hakatud kasutama liposoomi vaktsiinide organismidesse viimiseks. [15]

Toiduainetööstuses on liposoomi kasutatud toidu koostisosade organismi kandjatena ja neil on mitmeid sarnaseid rakendusi ka toiduainetööstuses, sealhulgas tundlike koostisosade kaitsmine, toitainete biosaadavuse suurendamine ja soovimatu maitse piiramine. Liposoomid on võimalikud lisaainetena kapseldama vitamiine, antioksüdante, valkusi, peptiide, antimikroobseid aineid, eeterlikke õlisid, maitseaineid, ensüüme, mineraale ja rasvhappeid. Liposoomi on kasutatud toiduainetööstuses näiteks juustu maitseomaduste parandamiseks, antioksüdantide, askorbiinhappe ja tokoferoolide lisamiseks funktsionaalse toitumise edendamiseks, erinevate mineraalide (raud) stabiliseerimiseks piimas. Ensüümide kapseldamine liposoomidesse võimaldab juustutööstusel toote valmistamise looduslikust toorainest kunstlikke ained lisamata, sest liposoomide vesiikulid aitavad ennetada kaseiinivalgu varast hüdrolyüsi tootmisprotsessi käigus. [16]

Kosmeetikatööstuses kasutatakse liposoomi peamiselt samadel põhjustel – vajalike ühendite kaitsmiseks väliskeskkonna mõjude eest ning nende transportimiseks inimorganismi. Liposoomide sisaldusega tooted aitavad paremini nahka niisutada ja muuta seda elastsemaks,

sest toit- ja mineraalained viiakse otse naharakkudesse. Samuti on liposome kasutatud erinevate juuksehooldustoodete valmistamisel. Antioksidantide inkorporeerimisel liposoomidega esineb kosmeetikatoodete puhul teatavaid probleeme, seda just toodete pikemaajalise säilivusperioodi saavutamise vajadusest. [2,17]

## 1.5. Piesoelement

Piesoelektriliseks nähtuseks on kristallilise struktuuri võime genereerida elektripinget sellele mehhaanilise surve avaldamisel [18]. Piesoelemendi kristallile elektrivälja rakendamisel muutub piesoelektrilise pöörddefekti toime kristalli paksus vastavalt kristalli vastastahkudele rakendatavale pingele [19]. Piesokeraamilisest materjalist valmistatud elemendil on geomeetriast sõltuv omavõnkesagedus. Vahelduvpinge rakendamisel piesoelemendile selle enda resonantssageduse lähedasel sagedusel põhjustab elemendi tugeva vibratsiooni. [18]

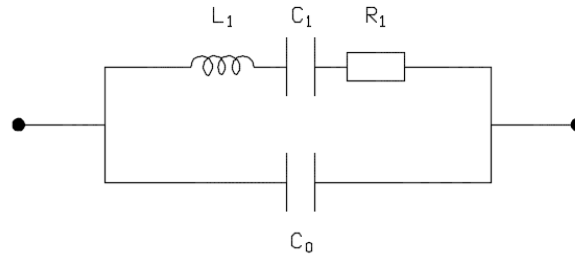
Üheks levinumaks piesokeraamiliseks materjaliks on plii-tsirkonaat-titanaat (PZT). Sellest on võimalik valmistada erinevaid tajuereid ja täitureid mille kasutusvaldkond on mitmekesine. Piesoelektrilist efekti kasutatakse erinevate mehaaniliste süüteseadmete valmistamiseks (gaasipõletid, valgumihklid), võnkesageduse filterelementide valmistamiseks (kvarts-resonaatorid), andurite valmistamiseks (mehaanilise deformatsiooni mõõtmine rõhu-, jõu- ja kiirendusandurites), piesokeraamiliste valjuhääldite valmistamiseks (summerid). Elektrikitarride helipeades leiavad piesotajurid kasutamist mehaaniliste võngete muundamiseks elektriliseks helisagedussignaali ning piesoelement resonantssagedusel võib olla ultraheli allikaks (ultraheli sagedusel toimivad puhastusseadmed). [18] Tabelis 1.1. on toodud väljavõtte erineva geomeetriaga piesoelementide omavõnkesageduse ja mahtuvuse nimiväärtustest.

**Tabel 1.1.** Piesoelemendi geomeetriast sõltuv omavõnkesagedus [18]

Läbimõõt, mm	Paksus, mm	Resonants- sagedus, kHz	Mahtuvus, pF
40	2,5	54	5600
40	3,0	54	4600
50	2,5	43	8900
50	3,0	43	7400
60	5,0	36	6500

Piesoelemendi sisetakistus on mahtuvuslik, seega moodustab piesoelement elektrilises askeemis lihtsustatult kondensaatori. Mahtuvusliku iseloomu tõttu tohib teda koormata

üksnes takistuslikult. [20] Piesoelemendi elektrilist askeemi on võimalik koostada ka põhjalikumalt ning seeläbi leida arvutuslikult piesoelemendi erinevaid karakteristikuid. Piesoelemendi elektriline askeem on esitatud joonisel 1.8. [18]



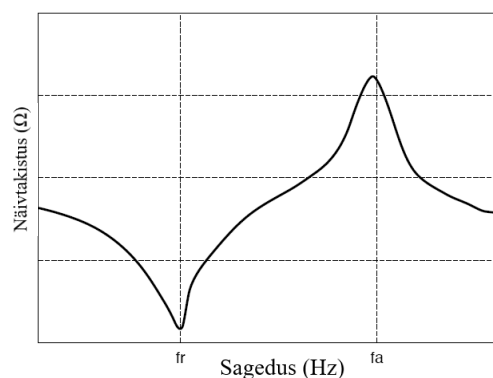
**Joonis 1.8.** Piesoelemendi elektriline askeem.

Joonisel 1.8. toodud ahela komponentide väärtusi teades on võimalik arvutuslikult leida piesoelemendi resonants-sagedus ( $f_r$  – valem 1.1.) ning antiresonants-sagedus ( $f_a$  – valem 1.2.).

$$f_r = \frac{1}{(2 \cdot \pi \cdot \sqrt{L_1 \cdot C_1})} \quad (1.1.)$$

$$f_a = \frac{1}{(2 \cdot \pi \cdot \sqrt{\frac{L_1 \cdot C_0 \cdot C_1}{C_1 + C_0}})} \quad (1.2.)$$

Teades kvartsstruktuuri resonants- ja antiresonants-sagedust on võimalik kujutada sellest valmistatud elemendi näivtakistuse sõltuvus sagedusest (joonis 1.9.). [18]



**Joonis 1.9.** Piesoelektrilise anduri näivtakistuse karakteristik. [18]

Praktikas resonants- ja antiresonants-sagedused minimeerivad ning maksiveerivad piesokristallist valmistatud elemendi näivtakistuse väärtuse. [18]

## 2. MATERJAL JA METOODIKA

### 2.1. Kasutatav seade

Käesolevas töös on liposoomide valmistamise meetodiks valitud ultrahelivanni abil uuritava lahuse mõjutamine ning katsete läbiviimiseks võetud kasutusele seade ultrahelipesur U600. Nimetatud seade on esitatud joonisel 2.1.



**Joonis 2.1.** Ultrahelipesur U600.

Valitud seade ei ole mõeldud tööstuslikuks kasutamiseks ning on jaekaubandusest soetatav. Seadme peamiseks kasutusvaldkonnaks on erinevate toodete puhastamine vedelikus, mida mõjutatakse ultrahelisagedusega võngete abil, mis tekitatakse seadme mahuti küljes asetseva piesoelemendi poolt.

Ultrahelipesu põhineb ultraheli signaali poolt tekitataval tugeval kavitatsiooniefektil. Tänu sellele tekivad seadme mahutis asuva puhastatava eseme pinnale kavitatsioonimullid, mis tekitavad tugevaid surve lööke ning seeläbi eemaldavad eseme pinnalt sinna kinnitunud mustuse, eset ennast kahjustamata [21].



Samuti on liposoomide läbimõõdu vähendamisel kavitasioonil töötlemise käigus oluline roll ning seetõttu on võimalik antud seadme abil uurida, kuidas see mõjutab erineva suurusega liposoomide tekkimist [10]. Seadme tehnilised andmed on esitatud tabelis 2.1.

**Tabel 2.1.** Ultrahelipesuri U600 tehnilised andmed

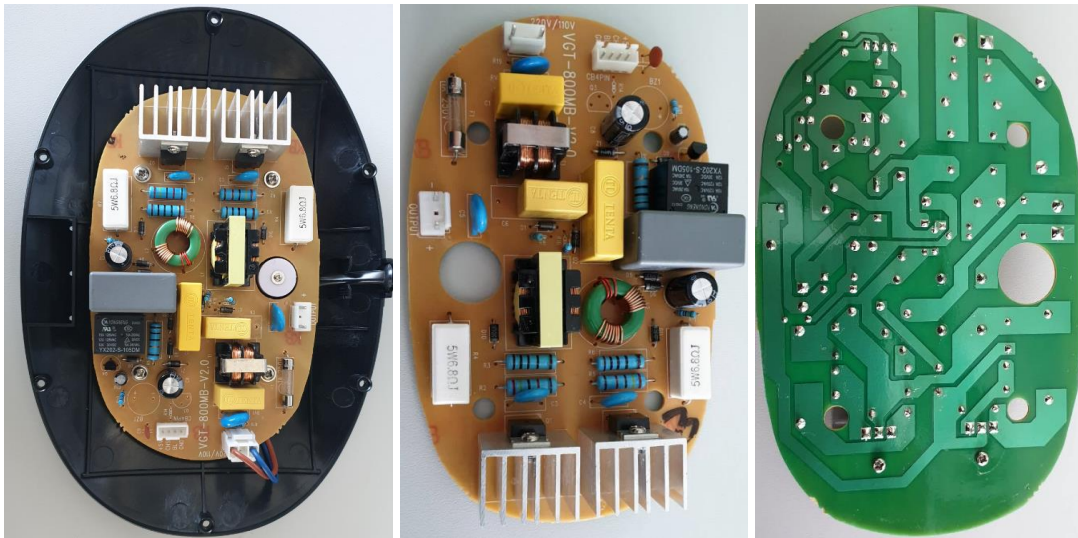
Vanni maht	600 ml
Pinge	230 V
Ultraheli sagedus	40 kHz
Automaatne väljalülitus	5 min
Vanni mõõtmed	P155 × L150 × K50 mm
Seadme mõõtmed	P210 × L150 × K120 mm
Mass	0,7 kg
Vanni materjal	Roostevaba teras
Seadme korpuse materjal	ABS plastik

Valitud seadmel on ultraheli väljundsignaali sagedus ning amplituud kindlate parameetritega ning nende parameetrite muutmiseks pidi töö autor seadme elektroonikaskeemi modifitseerima, et vastavalt katsete käigule oleks võimalik muuta väljundsignaali sagedust ja amplituudi.

## 2.2. Seadme elektrooniline skeem

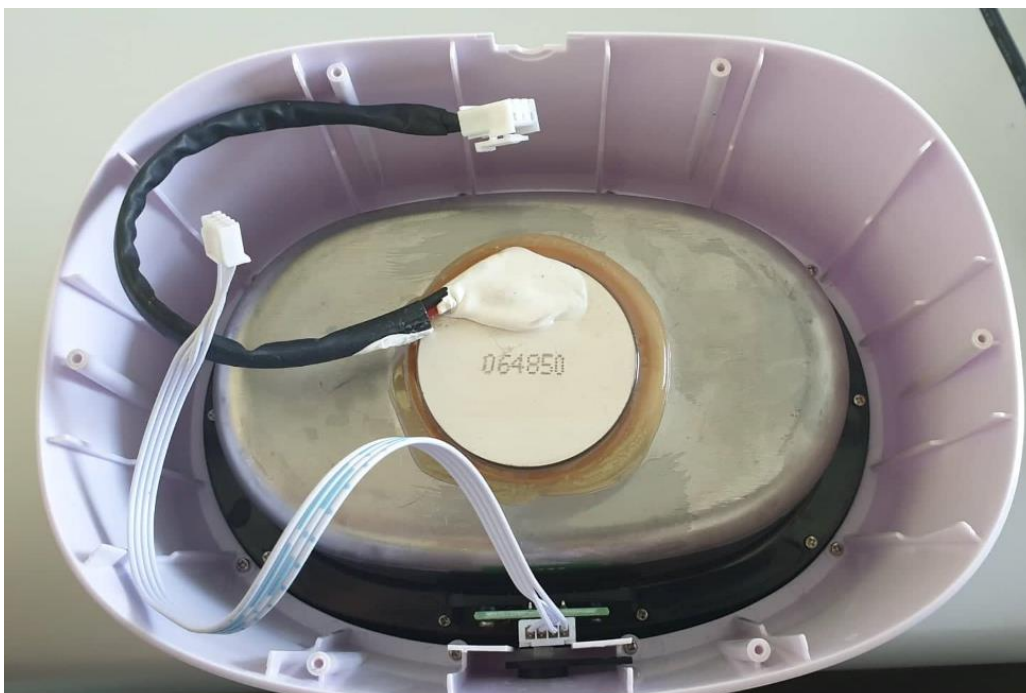
Seadme korpuse avamise järel oli võimalik tutvuda seadme valmistaja poolt koostatud tehnilise lahendusega ning vaadelda elektroonikaskeemi ning selles paiknevaid elektroonikakomponente. Vaated ultrahelipesuri U600 elektroonilisele skeemile on toodud joonisel 2.2. Trükkplaat on kinnitatud seadme korpuse põhja külge ning seadme toitejuhtme ning trükkplaadilt väljuvate juhtmete ühendused on lahendatud kergesti lahti ühendatavate pistikute näol, võimaldades trükkplaadi seadme küljest lihtsasti eemaldamise. Trükkplaadi seadmest eemaldamise järel oli võimalik tootjapoolse skeemilahenduse ülesjoonistamine koos kõikide skeemis kasutatud komponentide ülesmärkimisega.

Seadme skeemiga tutvumisel jõudis autor järeldusele, et väljundsignaali parameetrite lihtsale ja operatiivsele muutmisele puudub olemasolevat skeemilahendust kasutades ja seda modifitseerida üritades lahendus. Seega tuli töö käigus muuta esialgset plaani ning leida alternatiivne lahendus ultraheli vanni tööparameetrite muutmiseks.



**Joonis 2.2.** Vaated ultrahelipesuri U600 trükkplaadile.

Autor otsus olemasolevat seadme trükkplaati ultraheli vanni töö juhtimiseks mitte kasutada ning koostada eraldiseisev lahendus, mis võimaldaks väljundsignaali parameetreid muuta. Olemasolevast seadmest võeti kasutusele ainult roostevabast terasest vann koos vanni külge epoksüüdvaigu abil kinnitatud piesoelemendiga. Vaade seadme mahutile ning selle külge kinnitatud piesoelemendile on esitatud joonisel 2.3.



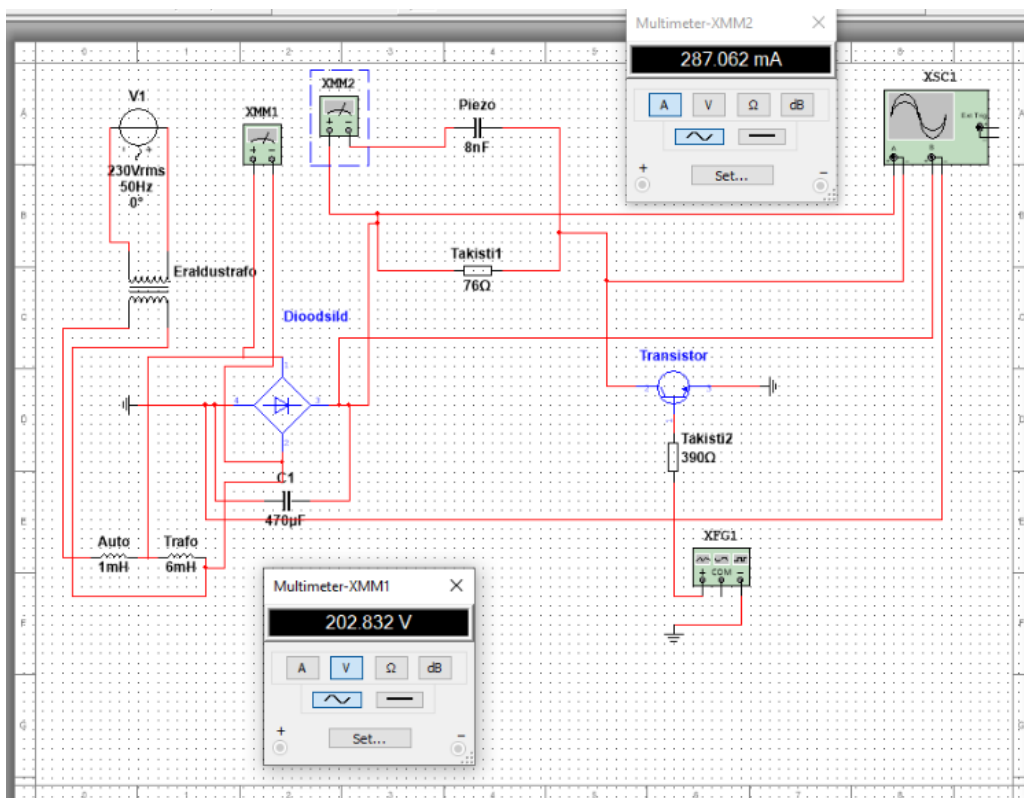
**Joonis 2.3.** Vaade ultrahelivanni põhjale kinnitatud piesoelemendile

### 2.3. Seadme juhtimiseks koostatud elektriline skeem

Olemasoleva ultrahelivanni töö juhtimiseks tuli koostada väline, originaalskeemist sõltumatu, elektriline skeem. Selleks tuli skeem kõigepealt koostada virtuaalselt. Selleks kasutati *National Instruments* poolt loodud tarkvarapaketi *Multisim*. Virtuaalse skeemi koostamine oli vajalik, et teoreetiliselt proovida ja katsetada erinevaid juhtimise skeemilahendusi ning nende võimalikku töötamist või mittetöötamist valitud piesoelemendiga.

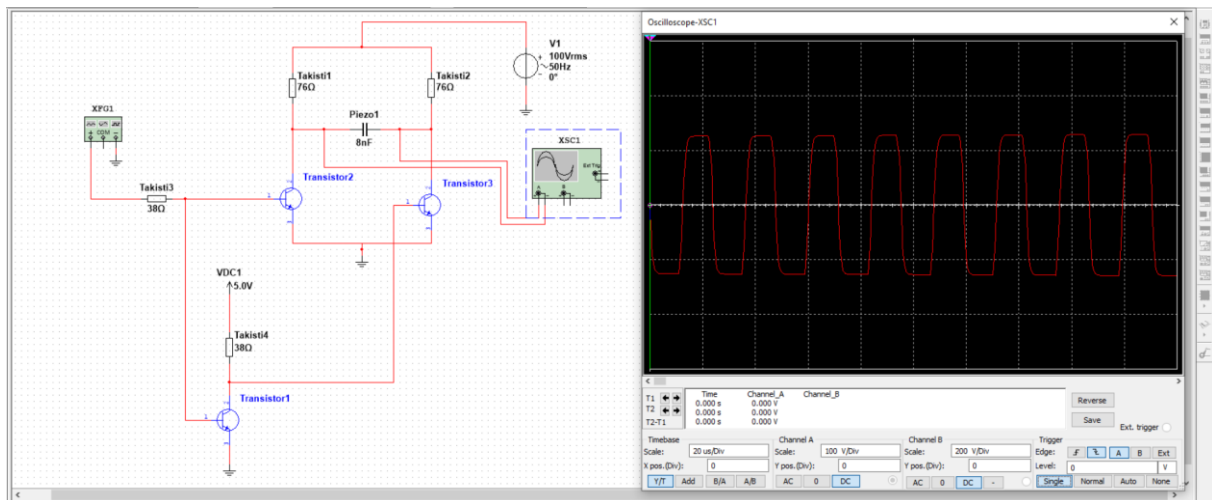
Teoreetiline skeem seadme töö juhtimiseks on koostatud selliselt, et piesoelemendi üks klemm on ühendatud toitepinge allika plussiga ning teine transistori kollektoriga, mis avatud transistori korral on ühenduses skeemi maandusega. Transistorit avanema ja sulguma lülitab transistori baasile ühendatud signaaligeneraatorist saabuv signaal.

Virtuaalse skeemi loomiseks tuvastati kõigepealt *LCR*-multimeetri (*PeakTech 2170*) abil piesoelemendi mahtuvuslik komponent. Selle väärtuseks mõõdeti 8 nF ning see võimaldas kasutada elektrilises asukeskis piesoelemendi asemel kondensaatorit [20]. Virtuaalse skeemi loomise järel koostati vastav skeem ka laboratooriumis ning skeemi täiustati vastavalt vajadusele lõpliku toimiva lahenduse leidmiseni. Katsetuste läbiviimiseks kasutatust leidnud juhtimise skeem keskkonnas *Multisim* on esitatud joonisel 2.4.



Joonis 2.4. Piesoelemendi juhtimise skeem koostatud *Multisim* keskkonnas.

Piesomuunduri juhtimiseks püüti leida ka alternatiivseid skeemilahendusi. Üheks teoreetiliselt sobivaks võimaluseks leiti piesoelemendile toitepinge juhtimine mitme transistori abil. Vastav skeem on esitatud joonisel 2.5.



**Joonis 2.5.** Mitme transistoriga piesoelemendi juhtimise skeem *Multisim* keskkonnas.

Mitme transistoriga skeemilahendus toimis küll *Multisim* keskkonnas, kuid laboritingimustes antud skeemilahenduse abil soovitud tulemuseni ei jõutud ning katsete läbiviimiseks kasutati ühe transistori abil toimivat lahendust.

## 2.4. Seadme juhtimise skeemi komponendid

Ultrahelipuhastusseadme juhtimiseks valitud komponendid on võetud kasutusele Eesti Maaülikooli laboratooriumi A114 seadmestiku hulgast. Katse läbiviimiseks vajalikud komponendid on eraldustrafo, autotrafo, dioodsild, kondensaator, erinevad takistid, signaaligeneraator, makettlaud, jõutransistor ning erinevad mõõtevahendid multimeetrite ja ostsilloskoopide näol.

Laboris asuvad töölaudad õppetöö ning erinevate katsete läbiviimiseks. Töölaudadel on erinevad väljavõtted seadmete toiteks. Nende abil on võimalik seadmeid ühendada otse võrgutoitele, võrgutoitele läbi eraldustrafo, ühendada seadmeid nii alalis- kui vahelduvpingele ning regulaatori abil ka sujuvalt muuta toitepinge väärtust. Töölaual paiknevad väljavõtted on toodud joonisel 2.6.



**Joonis 2.6.** Toitepinge väljavõtted laboratooriumi töölaual.

Seadme juhtimise skeem on ühendatud elektrivõrku eraldustrafo kaudu. Eraldustrafo kasutamine juhtimise skeemi toiteks on vajalik selleks, et tagada galvaaniline eraldatus toitevõrgust. Galvaaniline eraldatus on vajalik selleks, et juhtimise skeemis kasutatud komponendid ja mõõteseadmed ei põhjustaks sisselülitamisel toitevõrgus asuva rikkevoolukaitseülitite rakendumist ning seeläbi kogu juhtimise skeemi toite väljalülitumist.

Juhtimise skeemi järgmiseks komponendiks on piesoelemendi toitepinge tugevust reguleerida võimaldav autotrafo. Kasutatud autotrafo on näidatud joonisel 2.7. Autotrafo väljundpinge on sujuvalt reguleeritav ning autotrafo esipaneelil paiknev voltmeeter võimaldab visuaalselt tuvastada väljundpinge väärtust. Autotrafo väljundpinge määrab piesoelemendile jõudva pinge amplituudväärtuse.



**Joonis 2.7.** Autotrafo.

Autotrafo väljundpinge on siinuseline vahelduvvoolusignaali. Selle alaldamiseks alalisvoolupingeks on autotrafo väljundisse ühendatud sildalaldi ehk dioodsild. Kasutatud dioodsild on näidatud joonisel 2.8.



**Joonis 2.8.** Diodsild.

Diodsilla pulseeriva väljundpinge silumiseks on sildalaldi väljundklemmidele rööbiti ühendatud kondensaator. Kasutatud kondensaator on elektrolüütkondensaator toitepingele 250V ning mahtuvusega 470  $\mu\text{F}$ . Kasutatud kondensaator on esitatud joonisel 2.9.



**Joonis 2.9.** Elektrolüütkondensaator.

Piesoelemendile jõuab toitepinge, mille väärtus sõltub autotrafo seadistusest. Piesoelemendi teine klemm on ühendatud toitepinget katkestava komponendi ehk transistori kollektoriga. Valitud transistor on esitatud joonisel 2.10.



**Joonis 2.10.** Transistor.

Transistori lülitamiseks avatud ja suletud oleku vahel, et läbi kollektor-emitter ahela tekiks piesoelemendi maaühendus, on transistori tüürimiseks kasutatud laboratooriumis asuvat

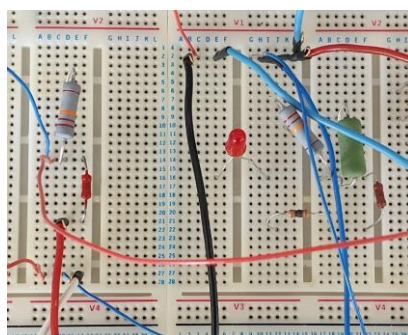


signaaligeneraatorit (*Peaktech DDS Function Generator 4045*). Signaaligeneraatori väljundsignaal suunatakse transistori baasile, ning generaatori abil valitud väljundsagedus määrab transistori lülitamise sageduse. Labori signaaligeneraator võimaldab väljundsignaali sagedust muuta vahemikus 10  $\mu\text{Hz}$  – 150 MHz [22]. Kasutatud signaaligeneraator on esitatud joonisel 2.11.



**Joonis 2.11.** Signaaligeneraator.

Vajalike elektriliste ühenduste tegemiseks on kasutusele võetud makettlaud, millel on võimalik hõlpsasti teostada erinevate juhtme ühendusi ning lisada skeemile vajalikke komponente. Kasutatud makettlaud on näidatud joonisel 2.12. Pieosoelemendi töö tagamiseks tuli elemendiga rööbiti ühendada takisti nimiväärtusega 76  $\Omega$ .



**Joonis 2.12.** Kasutatud makettlaud.

Toitepinge ning juhtsignaalide mõõtmiseks kasutati katsete ajal kahte erinevat ostsilloskoopi. Katsete ajal kasutatud ostsilloskoobid on esitatud joonisel 2.13. Joonisel vasakpoolne on võrgutoitel töötav ostsilloskoop (*PeakTech 1255*) ning joonisel parempoolne on autonoomse toitega ostsilloskoop (*Owon HDS1022M*).



**Joonis 2.13.** Katses kasutatud ostsilloskoobid.

Laboratooriumis valitud komponentidest koostatud skeem piesoelemendi juhtimiseks ning katse läbiviimine on esitatud joonisel 2.14. Jooniselt on välja jäänud stopper, milleks kasutati töö autori mobiiltelefoni.



**Joonis 2.14.** Koostatud katseskeem laboratooriumis.

Täiendavateks mõõteseadmeteks kasutati temperatuuri mõõtmiseks multimeetrit (*Finest 703 True RMS Multimeter*). Lisaks kasutati temperatuuri täiendavaks kontrollimiseks elavhõbetermomeetrit.

## 2.5. Sooritatud katsed

### 2.5.1. Ettevalmistused katseteks

Uurimaks ultrahelitöötuse mõju mikrokapslite tekkele ning nende suurusele määrati kõigepealt kindlad väärtused erinevatele muudetavatele suurustele. Muudetavateks suurusteks on:



1. Lahuse kontsentratsioon
2. Ultraheli signaali sagedus
3. Toitesignaali tugevus
4. Ultrahelitöötuse kestus

Ultrahelitöötuse mõju uurimiseks valmistatud lahustes kasutatud fosfolipiidiks oli sojaletsitiin. Kasutatud sojaletsitiin on esitatud joonisel 2.15. Granuleeritud kujul pakendatud letsitiinist valmistati katsete jaoks lahuseid kahel erineval korral. Esimesel korral valmistati kahe kontsentratsiooniga (2,5% ja 7,5%) lahuseid. Selleks soojendati kraanivesi kiirkeedukannu abil temperatuurini 60°C ning mõõdeti sellest kahte erinevasse kaussi 400 ml vett. Soojendatud veele lisati ühte kaussi 10 grammi letsitiini ning teise kaussi 30 grammi letsitiini. Letsitiin lahustati vees seda aeg-ajalt segades. Valmistatud lahused jäeti toatemperatuurile jahtuma ning katseid sooritati sellega järgmisel päeval.



**Joonis 2.15.** Lahuste valmistamiseks kasutatud letsitiin.

Teisel korral valmistati kolme erineva kontsentratsiooniga lahuseid. Valmistati 1,5 %, 2,5 % ja 3,5 % kontsentratsiooniga lahused. Selleks soojendati kraanivesi 60°C-ni ning mõõdeti kolme erinevasse anumasse igasse 200 ml vett. Veele lisati esimesel juhul kolm grammi, teisel juhul viis grammi ning kolmandal juhul seitse grammi letsitiini. Graanulid lahustati vees, lahust aeg-ajalt segades ning valmis lahused jäeti toatemperatuurile jahtuma ning katsed lahustega viidi läbi järgmisel päeval.

Seadme töötamisel on seadme valmistajatehase andmetel ultrahelisignaali sageduseks 40 kHz. Esimesed katsetused otsustati läbi viia koostatud juhtimisskeemi abil ning signaaligeneraatori abil sätestatud sagedustel 30 kHz ja 50 kHz ning järgnevad katsetused seadme valmistajapoolse juhtimisskeemi abil.

Eraldisesva juhtimisskeemi abil läbiviidud katsetustes rakendati autotrafot kasutades 75V ja 200V vahelduvpinge väärtusi, mis olid alaldatud täisperiood alaldiga ja silutud kondensaatoriga.

Töötlemise ajalise kestvuse mõju uurimiseks otsustati võtta lahusest proov pärast üheminutilist töötlust ning pärast viieminutilist töötlust. Samuti võeti valmistatud lahustest proovid enne nendele ultrahelitöötluste rakendamist.

### 2.5.2. Katsete läbiviimine

Katsete läbiviimiseks asetati uuritav lahus puhastusseadme mahutisse ning töödeldi seda ultrahelilainete abil. Katse läbiviimise ajal lülitati koos seadme käivitamisega tööle ka stopper ning iga katse läbiviimise korral jälgiti, et uuritavat lahust töödeldaks iga kord viieminutilise ajaperioodi jooksul. Seadme originaalse juhtimisskeemi kasutamise korral oli seadme väljalülitamise aeg viis minutit ning sama ajavahemikku ultrahelitöötlusteks rakendati uuritavale vedelikule ka välise juhtimisskeemi kasutamise korral. Katse käigus võeti proov ka ühe minuti möödumisel katse algusest ning nimetatud ajavahemik katse algusest fikseeriti stopperi abil.

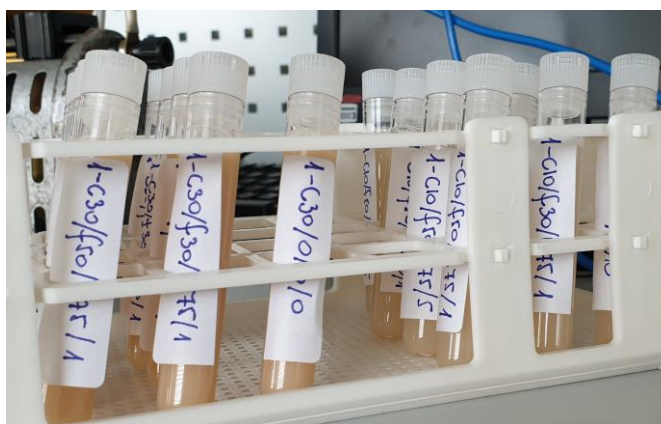
**Tabel 2.2.** Esimese katseseeria käigus kogutud proovide markeeringud

Jrk	Katseseeria	Kontsentratsioon, g/400ml	Sagedus, kHz	Toitepinge, V	Töötlemise aeg, min
1	1	10	0	0	0
2	1	10	30	75	1
3	1	10	30	75	5
4	1	10	30	200	1
5	1	10	30	200	5
6	1	10	50	75	1
7	1	10	50	75	5
8	1	10	50	200	1
9	1	10	50	200	5
10	1	30	0	0	0
11	1	30	30	75	1
12	1	30	30	75	5
13	1	30	30	200	1
14	1	30	30	200	5
15	1	30	50	75	1
16	1	30	50	75	5
17	1	30	50	200	1
18	1	30	50	200	5

Katsete läbiviimisel tuli koguda 18 erinevat proovi. Esimese katseseeria proovide markeeringud ning proovidele kohaldatud ultraheli sagedus, toitepinge ning töötlemise ajaline kestvus on esitatud tabelis 2.2.

Vastavalt tabelis 2.2. esitatud andmetele markeeriti kõik proovide kogumise ampullid katse läbiviimiseks seatud parameetrite infoga, et proovid oleksid ka hilisemalt korrektselt tuvastatavad.

Katse käigus kogutud proovid paigutati edasiseks analüüsiks ning uurimiseks vastava katse parameetritega markeeritud ampullidesse. Ampullide mahutavus on 5 ml. Kogutud proovide näidised on esitatud joonisel 2.16



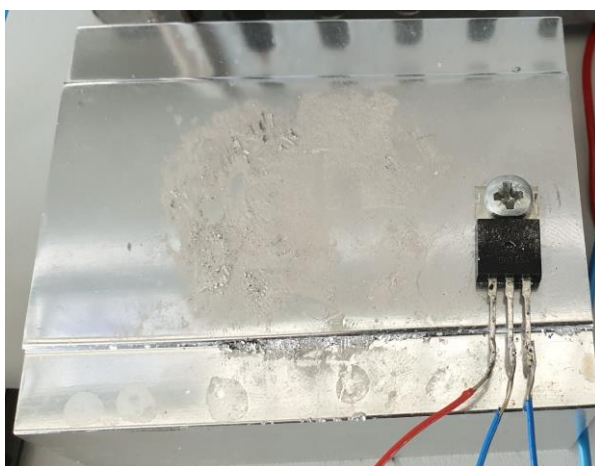
**Joonis 2.16.** Katse käigus kogutud proovid.

Pärast iga katse sooritamist ning uue katse alustamist pesti seadme mahuti ning proovide kogumise vahendid kraanivee all.

### **2.5.3. Temperatuurikatse**

Selgitamaks välja, kui suurt mõju lahuse temperatuurile avaldab lahuse töötlemine ultraheliga uuritava seadme abil, viidi kõigepealt läbi katse tuvastamiseks temperatuurimuudatusi uuritavas vedelikus töötlemise käigus. Seadme mahutis oli temperatuurikatse käigus kasutusel uuritava vedelikuna kraanivesi ruumi temperatuuril. Katse läbiviimiseks asetati mahutisse 400 ml vett ning selle algtemperatuuriks mõõdeti 20°C. Vedelikku töödeldi ultraheliga seitsme minuti jooksul ning piesoelemendi toitesignaali tugevuseks oli autotrafolt valitud 200 V ning signaaligeneraatorilt lülitamise sageduseks 50 kHz. Õhutemperatuur laboratooriumis oli katse läbiviimise hetkel 23°C.

Samaaegselt mahutis paikneva vedeliku temperatuuri mõõtmisele kontrolliti ka skeemis lülitava elemendi ehk transistori pinnatemperatuuri. Katse lõpuks oli transistori pinnatemperatuur tõusnud väärtuseni 95°C. Transistor ei ole mõeldud töötamaks nii kõrgel temperatuuril ning seetõttu võis antud elektroonikakomponent katsete läbiviimise käigus rikneda. Seetõttu tuli lisada juhtimise skeemi ka täiendavad jahutuselemendid transistorile. Soojuse tõhusamaks juhtimiseks transistorilt asetati transistor jahutusradiaatorile ning soojuse juhtimiseks radiaatorilt ümbritsevasse keskkonda asetati radiaatori kõrvale ventilaator. Jahutusradiaatorile kinnitatud transistor on toodud joonisel 2.17.

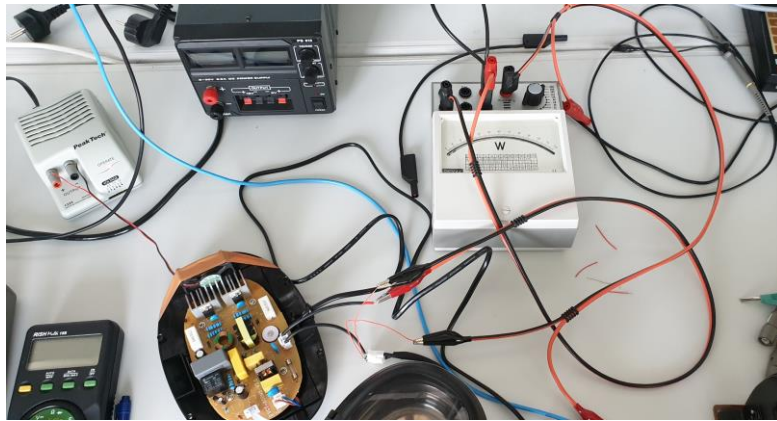


**Joonis 2.17.** Transistor koos jahutuselemendiga.

Jahutuselementide lisamise tulemusel ei tõusnud transistori pinnatemperatuur järgnevate katsetuste käigus kõrgemaks kui 47°C.

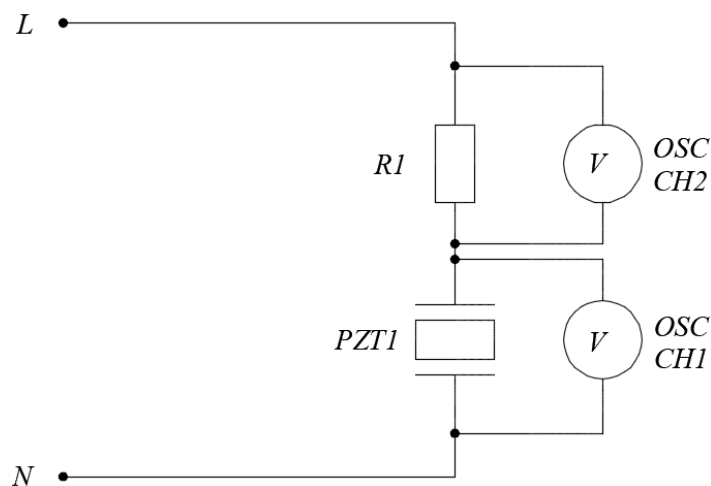
#### **2.5.4. Võimsuse mõõtmise katse**

Selgitamaks välja piesoelemendi elektrilist võimsust ja lahuse töötlemise energiakulu, viidi läbi kaks katset ultrahelisagedusel vibreeriva elemendi võimsuse mõõtmiseks. Esimeses katses ühendati piesoelemendi toiteskeemi vattmeeter. Selleks ühendati seadme mahuti originaalse juhtimisskeemi trükkplaadi küljest lahti selleks mõeldud kiirliitmiku abil ning piesoelemendi toiteahelasse ühendati lisajuhtmete abil vattmeeter. Võimsusekatse läbiviimine vattmeetriga on esitatud joonisel 2.18. Seadme sisselülitamisel fikseeriti visuaalselt vattmeetri näit. Vattmeetriga läbiviidud katse kohaselt on piesoelemendi võimsuseks mõõdetud 32 W, mis on ligilähedane tootja poolt kirja pandud 35 W-ga.



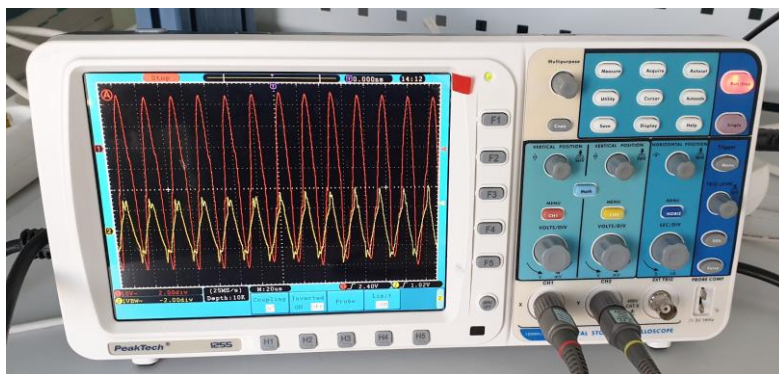
**Joonis 2.18.** Piesoelemendi võimsuse mõõtmine vattmeetriga.

Kontrollimaks vattmeetri abil saadud tulemust piesoelemendi võimsuse kohta koostati täpsemateks mõõtmisteks eraldi katseskeem. Katseskeem on esitatud joonisel 2.19.



**Joonis 2.19.** Katseskeem pingete mõõtmiseks ahelas.

Piesoelemendi toiteahelasse ühendati jadamisi takisti ( $R1$ ) nimiväärtusega 7 oomi. Ostsilloskoobi (*PeakTech 1255*) kahe kanali mõõtejuhtmed ühendati ahelasse selliselt, et ostsilloskoobi esimene kanal (*OSC CH1*) mõõdaks pingelangu piesoelemendil (*PZT1*) ning ostsilloskoobi teine kanal (*OSC CH2*) mõõdaks pingelangu ahelasse lisatud takistil. Selline mõõteviis võimaldab mõõta pinget ahelas (pingelang piesoelemendil) ning arvutada koguahelat läbivat voolu (tekkinud pingelangu kaudu takistil). Pilt ostsilloskoobi ekraanil kuvatud pingete väärtustega katse käigus on esitatud joonisel 2.20.



**Joonis 2.20.** Pingete mõõtmine võimsuskatsel.

Seadme käivitamisel fikseeriti ostsilloskoobi abil vastavad pingeväärtused ahela komponentidel, ning ostsilloskoobi tarkvara abil salvestati mõõtmisandmed edasiseks andmetöötluks ning arvutusteks.

## 2.6. Liposoomide suurusjaotuse määramine

### 2.6.1. Osakeste suurusjaotus mikromeetri skaalas

Kirjanduse põhjal selgus, et liposoomide võimalik suurusjaotus on väga laia diapsooniga (10-5000 nm) [8]. Sellest tulenevalt tuli osakeste suurusjaotuse määramiseks kasutusele võtta kahe erineva mõõtevahemikuga analüsaatorid: *Mastersizer 3000* (mikromeetri skaala) ja *Zetasizer Nano ZS* (nanomeetri skaalas).

Proovide uurimiseks kasutatud seade *Mastersizer 3000* (*Malvern Instruments Ltd.*) võimaldab määrata osakeste suurusi vahemikus sõltuvalt proovist ja proovi ettevalmistusviisist 0,5  $\mu\text{m}$  kuni 2000  $\mu\text{m}$  [3.1]. Seade on kujutatud joonisel 2.21. Sellel toodud seadme esiplaanil asuv mahuti tuli täita puhta veega (laboratooriumis on kasutusel pöördosmoosi meetodil puhastatud vesi) ning seejärel lisada pipeti abil samasse mahutisse piisav kogus võetud proovist. Kõiki proove lisati mahutisse kuni saavutati neelduvus (*obscuration*) 6%. Seejärel sooritati osakeste suurusjaotuse analüüs. Selliseks vajalikuks kontsentratsiooni saavutamiseks tuli lisada orienteeruvalt 2 ml näidist. Vastav info mahutis paikneva lahuse kontsentratsiooni kohta kuvati seadmega ühendatud personaalarvuti monitorile ning õige kontsentratsiooni saavutamisel tuli arvuti abil käivitada mõõteseadme töö. Seadme töö käivitamisel sooritas seade iga prooviga kolm mõõtmist ning kuvas saadud tulemused arvuti monitorile vastava tarkvara abil millega oli võimalik tulemused edasiseks analüüsiks salvestada. Mõõtmiste tulemuste kuvamise järel tuli seadme mahuti läbi pesta puhta veega.





**Joonis 2.21.** Osakeste analüsaator Mastersizer 3000.

Seade kasutab osakeste suuruse uurimiseks laservalguse hajumise meetodit [23]. Iga analüüsitud prooviga sooritatud kolmest katsest on võimalik leida seadme tarkvara abil kolme katse mõõtmistulemuse kohta keskmine tulemus ning osakeste suuruse esinemise kohta koostada vastav diagramm.

### **2.6.2. Osakeste suurusjaotus nanomeetri skaalas**

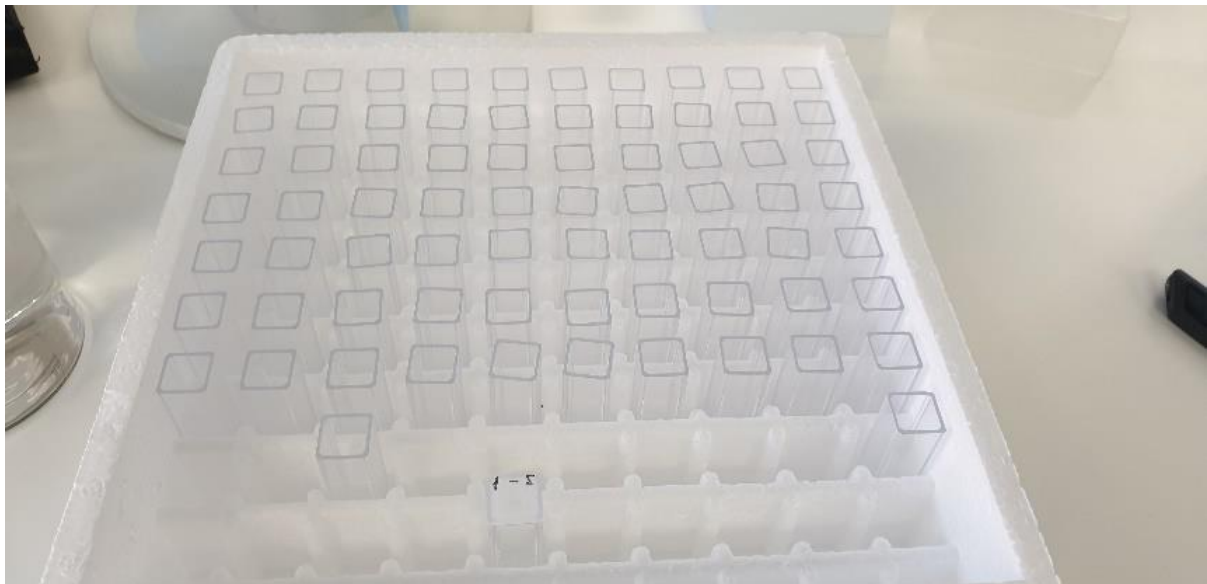
Vaatlemaks kogu teadaolevat liposoomide tekkimise skaalat nende suuruste põhjal tuli kasutusele võtta ka nanomeetri skaalas osakeste suurst määrata võimaldav seade. Teise laboratoorse seadmega on alates kolmandast katseseeriast kõiki töödeldud ja töötlemata lahusest võetud proove analüüsitud seadmega *Zetasizer Nano ZS*. Seade on esitatud joonisel 2.22.

Osakeste suurusjaotus (hüdrodünaamiline diameeter) määrati valguse hajumise meetodil (*DLS* – *Dynamic Light Scattering*) analüsaatoriga *Zetasizer Nano ZS* (*Malvern Instruments Ltd.*), mille valguse allikana kasutatakse 633 nm lainepikkusega He-Ne laserit. Analüsaatori detektor oli fikseeritud 173° nurga all. Analüüsiks kasutati üldise suuruse (*General purpose*) automaatset seadistust. Seadme mõõtevahemik on 0,3 nm kuni 10 µm. [24]



**Joonis 2.22.** Analüsaator *Malvern Zetasizer Nano ZS*.

Seadme *Zetasizer* kasutamiseks tuleb proovid analüüsimiseks ette valmistada. Analüüside läbiviimiseks ultraheliga töödeldud lahusest valmistatakse igaks mõõtmiseks kindla kontsentratsiooniga proov. Proovid asetatakse seadmesse sobivatesse küvettidesse. Küvetid on toodud joonisel 2.23.



**Joonis 2.23.** Proovide ettevalmistamise küvetid.

Küvettidesse tuli valmistada proov kontsentratsiooniga 1:50. Ühe osa uuritava lahuse kohta tuli küveti lisada 50 osa puhast vett. Proovide ettevalmistamisel kasutati samuti pöördosmoosi



meetodil puhastatud vett. Korrektsete vedelike kogusete paigutamiseks küvettidesse kasutati laboratooriumis automaatpipette. Kasutust leidnud automaatpipetid on toodud joonisel 2.24.



**Joonis 2.24.** Kasutatud automaatpipetid.

Küveti viidi sinise markeeringuga (joonisel paremal) pipetiga 1 ml puhast vett ning kollase markeeringuga (joonisel vasakul) pipetiga 20 µl suurune kogus vedelikku analüüsimiseks võetud lahusest. 20 µl uuritavat lahust 1000 µl puhta vee kohta tagab seadmele sobiliku kontsentratsiooniga lahuse 1:50-le.

Proovi ettevalmistamise järel asetati küvett seadmesse *Zetasizer* ning kaeti see vastava kaanega. Seadmesse asetatud küvett on toodud joonisel 2.25. Proovi analüüsimiseks soojendas seade sellesse asetatud küveti koos lahusega kõigepealt temperatuurini 25 °C ning seejärel asus lahust analüüsima. Seadme tarkvara oli seadistatud selliselt, et igast proovist salvestas seade neli mõõtmistulemust ning iga tulemuse salvestamiseks sooritas seade iga kord 15 mõõtmist. Seega sooritas seade iga prooviga kokku 60 mõõtmist ning salvestas nende põhjal neli tulemust.



**Joonis 2.25.** Analüüsimiseks seadmesse paigutatud küvett.

*Zetasizeri* abil saadud tulemustest annab kõige parema ülevaate, kui võrrelda seadme tarkvara poolt väljastatud tulemustes veerus *Z-Average* olevaid väärtusi. Antud veerg iseloomustab osakeste hüdrodünaamilist läbimõõtu lahuses ning on antud meetodi puhul indikaatoriks lahuses esinevate osakeste suuruste kohta.

## 2.7. Andmete statistiline töötlus

Andmete töötlemiseks ja tulemuste analüüsimiseks kasutati tabelarvutusprogrammi *Microsoft Excel*-i mitmeid funktsioone. Katseandmete võrdlemisel seatud hüpoteeside kontrollimiseks viidi läbi erinevaid statistilise analüüsi protseduure (*t-Test*). Proovide tulemuste võrdlemisel seati hüpoteesiks, et võrreldavate valimite väärtused on teineteisest erinevad ehk ultrahelitöötlusel on katsete läbiviimisel mõju liposoomide suurusjaotusele ning proovide tulemused on erinevad (*t-Test: Paired Two Sample Assuming Unequal Variances*). Välja arvatud lahuse hoiustamise mõju analüüsimisel, kui seati hüpoteesiks, et võrreldavate valimite väärtused on võrdsed ehk hoiustamine ei avalda liposoomide suurusjaotusele mõju (*t-Test: Paired Two Sample Assuming Equal Variances*). Hindamaks, kas saadud tulemuste varieeruvus on juhuslik või statistiliselt oluline seati tõenäosuse piirväärtuseks 5% ehk  $p < 0,05$ . [25]

P-väärtuse korral  $p < 0,05$  hinnati andmete erinevus statistiliselt oluliseks, ehk tulemuste erinevus ei olnud 95 protsendilise tõenäosusega juhuslik. P-väärtuste korral  $p > 0,05$  hinnati andmed statistiliselt mitte oluliseks ehk tulemuste erinevus võis olla juhuslik. Tulemuste statistilisel analüüsil on kasutatud iga proovi kõigi nelja korduvmõõtmise andmeid, et tagada täpsemad tulemused.

Tulemuste illustreerimiseks koostatud joonised on samuti vormistatud *Excel*-is kasutades graafikute koostamise moodulit.

### 3. TULEMUSED JA ANALÜÜS

#### 3.1. Temperatuurikatse

Esimesena läbiviidud temperatuurikatse tulemused on esitatud tabelis 3.1. Katse tulemustest nähtub, et selle läbiviimise käigus tõusis mahutis oleva vedeliku temperatuur seitsme minuti pikkuse töötlusaja jooksul vaid kolm kraadi ja sellest lähtuvalt võib järeldada, et valitud maksimaalsed väärtused toitepinge ja lülitussignaali sageduse puhul ei avalda töötlemisel viieminutilise ajaperioodi korral niivõrd suurt mõju seadme mahutis oleva vedeliku temperatuurile, et temperatuuri tõus võiks omakorda mõjutada katse tulemusi.

**Tabel 3.1.** Temperatuurikatse tulemused

<b>Aeg</b>	<b>Vedeliku temperatuur, °C</b>
0:00	20
0:30	20
1:00	20
1:30	20
2:00	21
2:30	21
3:00	21
3:30	21
4:00	21
4:30	22
5:00	21
5:30	21
6:00	21
6:30	22
7:00	23

Temperatuurikatse õnnestunud läbiviimise järel jõudis autor tulemuseni, et temperatuuri tõusu võib lahuse töötlemisel jätta arvesse võtmata, asus autor läbi viima katseid fosfolipiidsete lahustega ning määrama osakeste suurusi erinevates lahustes.

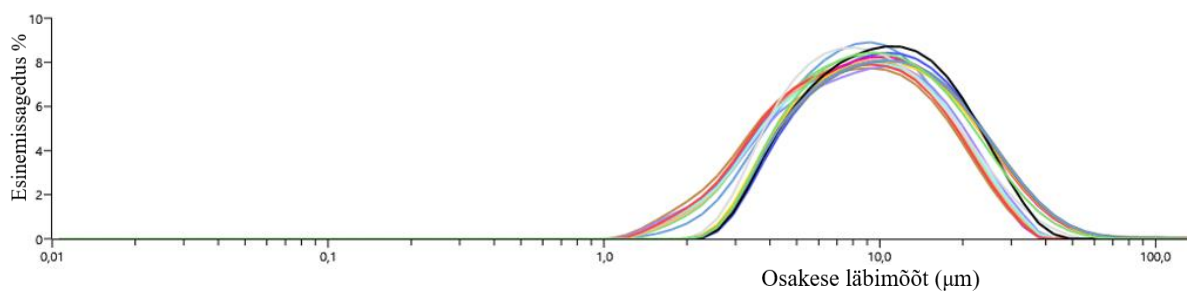
### 3.2. Osakeste suurus mikromeetri skaalas

Seadmega *Mastersizer* osakeste suurusjaotuse määramiseks läbiviidud katse tulemustest väljavõtte on toodud tabelis 3.2. Saadud tulemuste võrdlemiseks on võetud kasutusele veerg mood. Antud veerg iseloomustab proovis kõige enam esinenud osakeste läbimõõtude suuruseid.

**Tabel 3.2.** Esimese katseseeria tulemuste töötlus

Proovi nimetus	Kontsentratsioon, g/400 ml	Sagedus, kHz	Pinge, V	Kestus, min	Mood, μm
1-c30/0/0/0	30	0	0	0	9,10
1-c30/f30/u75/1	30	30	75	1	8,97
1-c30/f30/u75/5	30	30	75	5	9,05
1-c30/f30/u200/1	30	30	200	1	9,95
1-c30/f30/u200/5	30	30	200	5	9,12
1-c30/f50/u75/1	30	50	75	1	10,60
1-c30/f50/u75/5	30	50	75	5	9,51
1-c30/f50/u200/1	30	50	200	1	9,91
1-c30/f50/u200/5	30	50	200	5	9,25
1-c10/0/0/0	10	0	0	0	10,80
1-c10/f30/u75/1	10	30	75	1	10,10
1-c10/f30/u75/5	10	30	75	5	10,10
1-c10/f30/u200/1	10	30	200	1	10,60
1-c10/f30/u200/5	10	30	200	5	7,87
1-c10/f50/u75/1	10	50	75	1	10,80
1-c10/f50/u75/5	10	50	75	5	10,50
1-c10/f50/u200/1	10	50	200	1	11,10
1-c10/f50/u200/5	10	50	200	5	9,48

*Mastersizeri* tarkvara abil on erinevate mõõtetulemuste põhjal koostatud esinevate suurusjaotuste kohta diagramm, mis on esitatud joonisel 3.1.



**Joonis 3.1.** Esimese katseseeria proovide suurusjaotused.

Saadud tulemuste analüüsimisel leiti, et 7,5% kontsentratsiooniga lahuses on statistiliselt kõikide töödeldud proovide tulemused töötlemata proovidega niivõrd sarnased, et moodide erinevus ei ole statistiliselt oluline (t-Testi p-väärtus kõikidel juhtudel  $>0,05$ ). Seega võib järeldada, et 7,5% lahuse töötlemine ei ole lahuses leiduvatele suuremate (mikromeetriskaalasse jäävate) osakeste suurusele olulist mõju avaldanud ja muutuste mittetoimumise põhjuseks võib olla lahuse liiga suur kontsentratsioon.

3,5% kontsentratsiooniga lahuse töödeldud proovide moodide võrdlemisel selgus, et kahel töötluse juhul on moodide erinevus võrdluses töötlemata prooviga statistiliselt oluline ( $p < 0,05$ ). Nendeks proovideks on 1-c10/f30/u200/5 ( $p = 0,0056$ , osakeste keskmine läbimõõt vähenenud  $10,8\mu\text{m}$ -lt  $7,87\mu\text{m}$ -le) ja 1-c10/f50/u200/5 ( $p = 0,01$ , osakeste keskmine läbimõõt vähenenud  $10,8\mu\text{m}$ -lt  $9,5\mu\text{m}$ -le). Antud tulemustest võib järeldada, et osakeste suurusele on mõju avaldanud töötluse kestus viis minutit ning piesoelemendi toitepinge amplituud 200 V. Teiste proovide võrdlemisel töötlemata lahusega on tuvastatud, et P väärtus on  $>0,05$ .

Esimese katseseeria tulemustest tehti järeldus, et osakeste suurusele avaldab kõige rohkem mõju ultrahelitöötluse kestus ning juhtpinge amplituud. Samuti jõuti järeldusele, et valmistatud lahus kontsentratsiooniga 7,5% on liiga suure tihedusega, et koostud juhtimisskeemiga antud piesoelemendi ultrahelisignaali suudaks seda mõjutada.

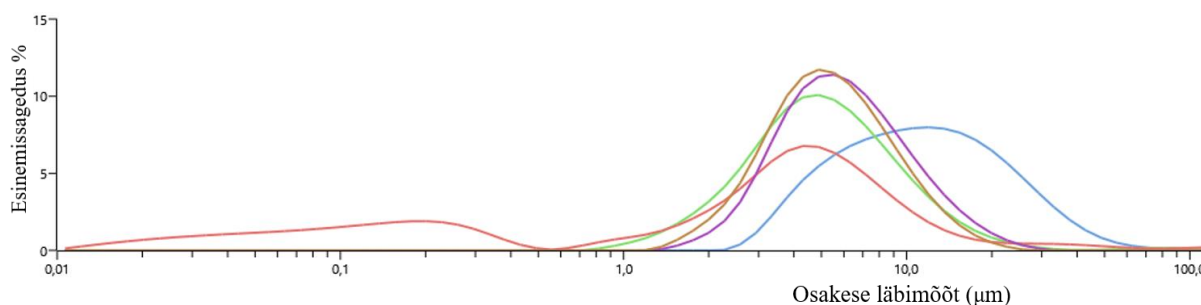
Teise katseseeria läbiviimisel muudeti ultrahelisignaali sagedust. Katseliselt tehti kindlaks mahutis paiknevale vedelikule mõjuv resonantssagedus. Sellise sageduse kindlakstegemiseks asetati mahutisse 400 ml kraanivett ning muudeti juhtsignaali signaaligeneraatorist 1 Hz sammuga suuremaks alates esimeses katses kasutatud signaalisagedusest 50 kHz. Visuaalselt tuvastati, et mahutis paiknevale vedelikule avaldab 50 kHz sagedusega signaalist tugevamat mõju signaal sagedusega 52,02 kHz.

Sellisel valitud sageduse ning seadme originaalskeemi abil viidi läbi kaks katset lahusega, mille kontsentratsioon oli 3,5%. Ultrahelitöötluse käigus võeti proovid mõlema sagedusega läbiviidud katse puhul kolme ja viie minuti möödudes katse algusest. Võetud proove analüüsiti sarnaselt esimesele katseseeriale laboratooriumis seadmega *Mastersizer 3000*. Saadud tulemustest on esitatud väljavõtte tabelis 3.3. sarnaselt esimese katseseeria tulemustele.

**Tabel 3.3.** Teise katseseeria tulemuste töötlus

Proovi nimetus	Kontsentratsioon, g/400 ml	Sagedus, kHz	Pinge, V	Kestus, min	Mood, $\mu\text{m}$
2-c10/0/0/0	10	0,00	0	0	11,80
2-3	10	40,00	230	3	4,77
2-5	10	40,00	230	5	4,48
2-c10/f52,02/u230/3	10	52,02	230	3	5,35
2-c10/f52,02/u230/5	10	52,02	230	5	5,00

Teise katseseeria tulemused on graafiliselt esitatud joonisel 3.2. Lahuse töötlemisel seadme originaalskeemi abil on kolmeminutilise töötuse järel osakeste keskmine läbimõõt vähenenud 11,8  $\mu\text{m}$ -lt 4,76  $\mu\text{m}$ -le ( $p = 0,0068$ ) ja viieminutilise töötuse järel 10,8  $\mu\text{m}$ -lt 4,48  $\mu\text{m}$ -le ( $p = 0,0064$ ). Lahuse töötlemisel välise juhtimisskeemi abil on kolmeminutilise töötuse järel osakeste keskmine läbimõõt vähenenud 11,8  $\mu\text{m}$ -lt 5,36  $\mu\text{m}$ -le ( $p = 0,0082$ ) ja viieminutilise töötuse järel 11,8  $\mu\text{m}$ -lt 5  $\mu\text{m}$ -le ( $p = 0,0074$ ). Seega on võimalik järeldada, et kõikide võetud proovide võrdlemisel töötlemata lahusega on osakeste suuruste muutumine statistiliselt oluline ning saadud tulemused ei ole juhuslikud.

**Joonis 3.2.** Teise katseseeria proovide suurusjaotused (sinine – töötlemata lahus, roheline ja punane – seadme originaalskeem, lilla ja pruun – koostatud juhtimisskeem).

Esimese kahe katseseeria analüüsimisel on tehtud järeldused:

- Ultrahelitöötuse mõju osakeste suuruse vähenemisele on tuvastatud ja osakeste keskmine läbimõõt on vähenenud viieminutilise töötuse järel originaalskeemi puhul 62,01% ja välise skeemi puhul 57,66%;
- Osakeste suurust mõjutavad kõige rohkem ultrahelitöötuse kestus ja signaali amplituud;
- Seadme välise juhtimisskeemi loomine on andnud soovitud tulemuse;
- Lahuse liiga suur kontsentratsioon takistab ultrahelitöötuse mõju;

- Kuigi mikromeetri skaala osakeste suurusjaotuses tuvastati teatavaid muutusi, on nende ulatus siiski tagasihoidlik. Seetõttu on kindlasti vajalik nanomeetri skaala osakeste suurusjaotuse analüüs.

### 3.3. Osakeste suurus nanomeetri skaalas

Kolmanda katseseeria peamiseks eesmärgiks on uurida muudatusi erineva kontsentratsiooniga valmistatud lahustes tekkivate alla 1000 nm suuruste liposoomide suurustes. Katse läbiviimiseks valmistati uued kolme erineva kontsentratsiooniga (1,5%, 2,5% ja 3,5%) lahused.

Katsete läbiviimine ja proovide võtmine toimus samadel põhimõtetel kui eelnevates katsetes. Võttes arvesse, et esimeste katsete tulemusel ilmnnes, et ultrahelitöötuse ajalise kestuse mõju omab suurt tähtsust osakeste läbimõõdule siis pikendati antud katses ultrahelitöötuse aega ning kolmanda katseseeria käigus töödeldi iga lahust kokku 10 minutilise perioodi jooksul. Lahust töödeldi seadme originaalskeemi abil ning sagedusega 40 kHz. Antud katseseeria käigus võetud proove analüüsiti seadmega *Zetasizer* ning andmete analüüsimisel on võetud kasutusel seadme tarkvara poolt väljastatud osakeste suurust väljendav parameeter *Z-Average*. Lahuste töötlemise käigus võeti proovid töötlemata lahustest ning ühe, viie ja 10-minutilise töötlusaja möödudes. Katse nelja mõõtmise keskmised tulemused on esitatud tabelis 3.4.

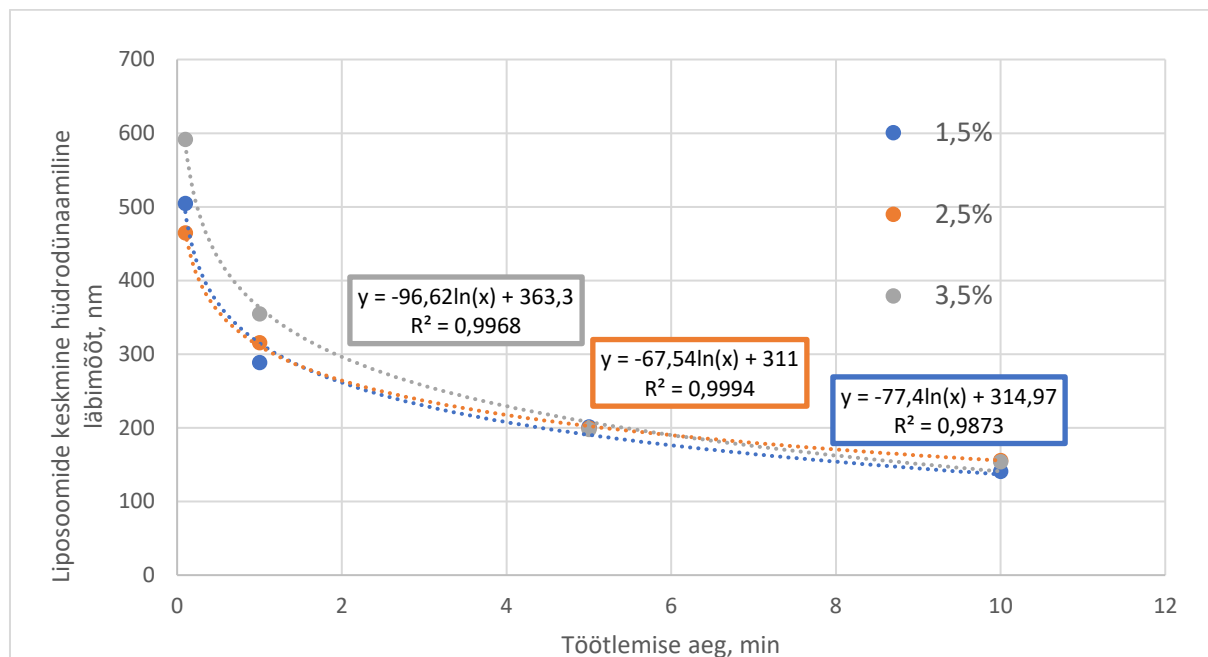
**Tabel 3.4.** Osakeste suurused erineva kontsentratsiooniga lahuses

Proovi nimetus	Kontsentratsioon, %	Ultraheli töötuse aeg, min	Z-Average, nm
3-C1,5/0	1,5	0	504,8
3-C1,5/1	1,5	1	288,5
3-C1,5/5	1,5	5	201,1
3-C1,5/10	1,5	10	140,9
3-C2,5/0	2,5	0	464,6
3-C2,5/1	2,5	1	315,7
3-C2,5/5	2,5	5	199,4
3-C2,5/10	2,5	10	155,6
3-C3,5/0	3,5	0	591,6
3-C3,5/1	3,5	1	354,7
3-C3,5/5	3,5	5	197,6
3-C3,5/10	3,5	10	153,8

Saadud tulemuste põhjal on koostatud graafik osakeste suuruste muutuse kohta, mis on esitatud joonisel 3.3. Mõõtetulemuste põhjal on leitud liposoomide hüdrodünaamilise diameetri



väheneb iseloomustav funktsioon ja esitatud seda kujutlev trendijoon lahuse kõigi kolme vaadeldud kontsentratsiooni korral.



**Joonis 3.3.** Nanomeetri skaalasse kuuluvate osakeste suuruse sõltuvus kontsentratsioonist.

Analüüsi käigus võrreldi sama töötlusaja läbinud proovide tulemusi erinevate kontsentratsioonide lõikes.

Autor leidis, et ultraheliga töötlemata lahuste puhul sõltub liposoomide (nanoskaala) keskmine läbimõõt kontsentratsioonist. Statistiliselt olulised erinevused tuvastati 1,5% ja 3,5% liposoomide keskmiste võrdluses (vastavalt 504,8 nm ja 591,6 nm;  $p=0,043$ ) ning 2,5% ja 3,5% kontsentratsioonide võrdluses (vastavalt 464,6 nm ja 591,6 nm;  $p<0,001$ ). 1,5% ja 2,5% kontsentratsiooniga lahuste erinevused ei olnud statistiliselt olulised (vastavalt 504,8 nm ja 464,6 nm;  $p=0,25$ ). Ühe minuti jooksul ultraheliga töödeldud proovide keskmise liposoomi läbimõõdu võrdlusel ilmnes sarnane trend: statistiliselt olulised erinevused tuvastati 1,5% ja 3,5% (vastavalt 288,5 nm ja 354,7 nm;  $p=0,032$ ) ning 2,5% ja 3,5% (vastavalt 315,7 nm ja 354,7 nm;  $p=0,018$ ) võrdluses. 1,5% ja 2,5% kontsentratsiooniga lahuste liposoomide keskmiste läbimõõtude võrdluses statistiliselt olulist erinevust ei tuvastatud (vastavalt 288,5 nm ja 315,7 nm;  $p=0,241$ ).

Viieminutilise töötamise läbinud lahuste tulemuste analüüsimisel ei täheldatud kontsentratsiooni mõju liposoomide keskmistele läbimõõtudele üheski võrdluses. 1,5% ja 3,5% kontsentratsioonide liposoomide keskmiste läbimõõtude võrdluses (vastavalt 201,05 nm ja 197,6 nm,  $p=0,21$ ), 2,5% ja 3,5% kontsentratsioonide võrdlemisel (vastavalt 199,43 nm ja

197,6,  $p=0,542$ ) ning 1,5% ja 2,5% kontsentratsioonide võrdlemisel (vastavalt 201,05 nm ja 199,43 nm,  $p=0,636$ ) ei olnud saadud tulemuste erinevused statistiliselt olulised. Sellest võis järeldada, et viieminutilise töötuse järel oli osakeste läbimõõt sõltumata kontsentratsioonist kõikides lahustes jõudnud ühtlasele tasemele ning liposoomide suurus ei sõltu enam kontsentratsioonist.

Kümneminutilise töötuse järel analüüsitud proovides leiti tulemustes statistiliselt olulisi erinevusi teatud proovide võrdlemisel. 1,5% ja 3,5% kontsentratsioonide tulemuste hindamisel leiti, et proovide erinevus oli statistilise olulisuse aspektist täpselt 5% usaldatavuse piiril (vastavalt 140,85 nm ja 153,83 nm,  $p=0,05$ ) ning seega võis suuruste erinevus olla nii oluline kui ka juhuslik. 2,5 % ja 3,5 % kontsentratsioonide keskmiste suuruste võrdlusel tuvastati et suuruste erinevus puudus statistiline olulisus (vastavalt 155,6 nm ja 153,83 nm,  $p=0,188$ ). 1,5 % ja 2,5 % kontsentratsiooniga lahuste hindamisel leiti suuruste erinevuses aga statistiliselt oluline erinevus (vastavalt 140,85 nm ja 155,6 nm,  $p=0,036$ ).

Kõige rohkem vähenes osakeste keskmine läbimõõt töötuse käigus väikseima kontsentratsiooniga (1,5%) lahuses (504,85 nm-lt 140,85 nm-le).

Liposoomide suuruse analüüsimisel on tehtud järeldused:

- Kuigi 1,5% ja 2,5% kontsentratsiooniga lahustes olevate liposoomide keskmiste suuruste erinevus ei olnud statistiliselt oluline ( $p=0,25$ ), on erineva kontsentratsiooniga lahustes enne ultrahelitöötlust osakeste (liposoomide) hüdrodünaamiline läbimõõt üsnagi erinev 504,85 nm (1,5% lahuses) 464,6 nm (2,5% lahuses) ja 591,63 nm (3,5% lahuses). Läbimõõtude erinevus on 2,5% ja 3,5% lahuse võrdluses 21,47%;
- Ultrahelitöötuse jooksul liposoomide hüdrodünaamiline läbimõõt väheneb;
- Viieminutilise töötuse järel tekkinud osakesed on sõltumata lahuse kontsentratsioonist sarnase läbimõõduga (läbimõõtude erinevus 1,72%);
- Ultrahelitöötuse jätkamisel jätkub ka liposoomide läbimõõdu vähenemine ning kõige rohkem mõjutab ultrahelitöötus väiksema kontsentratsiooniga (1,5%) lahuses moodustunud liposoomide (läbimõõtude erinevus 9,48%).

### **3.4. Liposoomide stabiilsus säilitamisel**

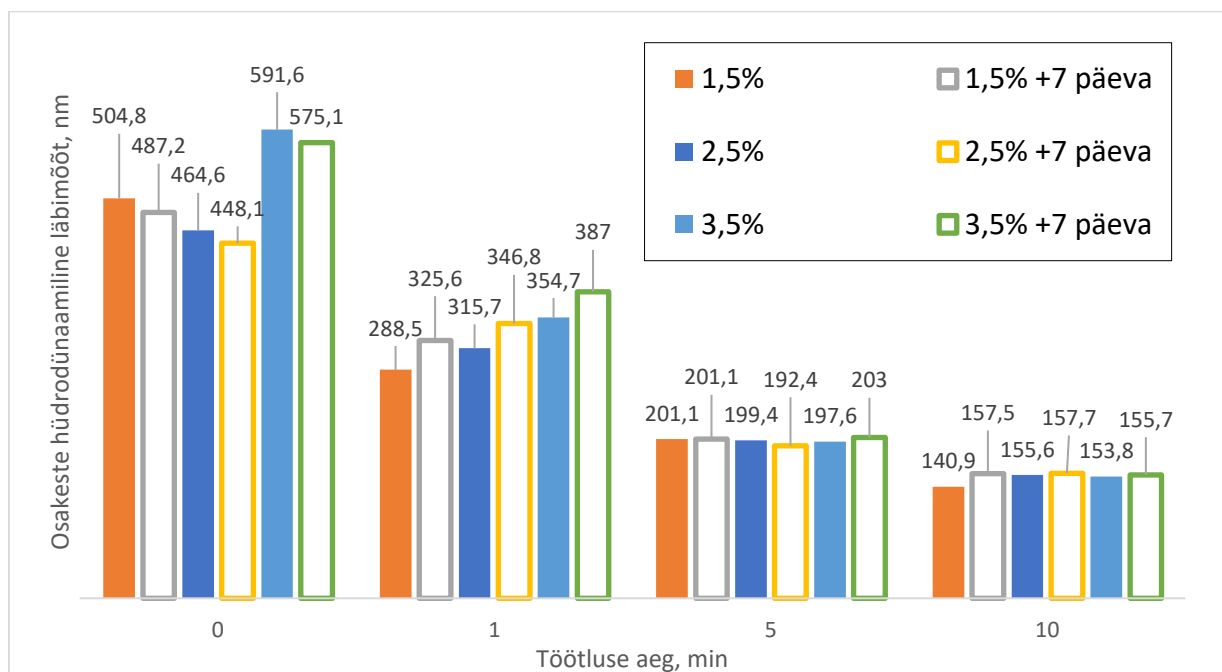
Järgmine katsetuste seeria viidi läbi hindamaks, millisel määral mõjutab juba eelnevalt töödeldud lahuses esinevate osakeste suurust lahuse säilitamine teatud ajaperioodi jooksul.

Kolmanda katseseeria käigus töödeldud lahustest võetud proovid asetati külmikusse ning samasugused mõõtmised nagu viidi läbi kolmanda katseseeria puhul, viidi nädal aega hiljem uuesti läbi. Eelmise katseandmete tabelile (tabel 3.4.) on lisatud kordusmõõtmiste tulemused ning need on esitatud tabelis 3.5.

**Tabel 3.5.** Katsete kordusanalüüsi tulemused 7 päeva hiljem

Proovi nimetus	Kontsentratsioon, %	Ultraheli töötamise aeg, min	Z-Average, nm	Z-Average, nm; 7 päeva hiljem
3-C1,5/0	1,5	0	504,8	487,2
3-C1,5/1	1,5	1	288,5	325,6
3-C1,5/5	1,5	5	201,1	201,1
3-C1,5/10	1,5	10	140,9	157,5
3-C2,5/0	2,5	0	464,6	448,1
3-C2,5/1	2,5	1	315,7	346,8
3-C2,5/5	2,5	5	199,4	192,4
3-C2,5/10	2,5	10	155,6	157,7
3-C3,5/0	3,5	0	591,6	586,4
3-C3,5/1	3,5	1	354,7	387,0
3-C3,5/5	3,5	5	197,6	203,0
3-C3,5/10	3,5	10	153,8	155,7

Proovide analüüside tulemuste võrdlemiseks on koostatud graafik (joonis 3.4.), kus analüüsitud proovid on jagatud töötusaja kestuse alusel nelja gruppi. Igas grupis on esitatud kõikide kontsentratsioonide nädalase vahega analüüsitud proovid kõrvuti, kus nädal aega hiljem analüüsitud proov on kujutatud seest tühja tulbana.



**Joonis 3.4.** Osakeste läbimõõdu muutus samade proovide testimisel nädal aega hiljem

Katseandmete analüüsimisel ilmnes, et töötlemata lahuse puhul on nädal aega külmkapis seisnud lahuses esinenud osakeste läbimõõdus teatav vähenemine. Läbimõõdu muutus lahustes on 1,5% lahuse puhul 504,8 nm-lt 487,2 nm-le (vähenemine 3,51%), 2,5% lahuse puhul 464,6 nm-lt 448,1 nm-le (vähenemine 3,54%) ja 3,5% lahuse puhul 591,6 nm-lt 575,1 nm-le (vähenemine 2,80%). Muutused on kõikide kontsentratsioonide puhul niivõrd väikesed, et statistilise analüüsi tulemusel ei osutunud need olulisteks (kõikide kontsentratsioonide võrdlemisel  $p>0,05$ ). See võimaldab järeldada, et töötlemata lahuses osakeste suurus nädalase säilitamisperioodi jooksul ei muutunud.

Minimaalselt töödeldud (üks minut) lahuse puhul võib vastupidiselt töötlemata lahusele täheldada kõikide kontsentratsioonide puhul liposoomide läbimõõdu teatavat suurenemist. 1,5% lahuse puhul 288,5 nm-lt 325,6 nm-le (suurenemine 12,86%), 2,5% lahuse puhul 315,7 nm-lt 346,8 nm-le (suurenemine 9,85%) ja 3,5% lahuse puhul 354,7 nm-lt 387,0 nm-le (suurenemine 9,09%). Statistilise analüüsi kohaselt osutus 1,5% kontsentratsiooni puhul erinevus juhuslikuks ( $p=0,108$ ), 2,5% ja 3,5% lahuste korral osutusid seitsmepäevase säilitamise jooksul tekkinud läbimõõdu erinevused statistiliselt olulisteks ( $p$ -väärtused vastavalt 0,011 ja 0,019). Ammendav vastus küsimusele, kas lühiajalise (üks minut) töötamise puhul võib olla tegemist olukorraga, kus ultrahelitöötlus on töötlemata lahusega võrreldes liposoomide suurusi küll vähendanud, kuid moodustunud struktuurid on liiga ebastabiilsed selleks, et säilitada oma kuju [11], vajab täiendavaid vaatlusi.

Viieminutilise töötamise läbinud lahuste nädalase säilitamise korral leiti, et 1,5% lahuses on osakeste läbimõõt suurenenud 201,05 nm-lt 201,08 nm-le (suurenemine 0,01%), 2,5% lahuses läbimõõt vähenenud 199,43 nm-lt 194,43 nm-le (vähenemine 3,51%) ja 3,5% lahuses suurenenud 197,6 nm-lt 203,03 nm-le (suurenemine 2,75%). Statistilist olulisust analüüsides osutus 2,5% proovi puhul muutus oluliseks ( $p=0,037$ ) ning 1,5% ja 3,5% puhul ebaoluliseks ( $p$ -väärtused vastavalt 0,993 ja 0,085). Hinnates läbimõõtude muutusi kontsentratsioonist sõltumata leiti, et viieminutilise töötamise läbinud osakesed on piisavalt stabiilsed ja nädalase hoiustamise käigus osakeste läbimõõt muutunud ei ole ( $p>0,05$ ).

Sarnaselt viiele minutile osutusid ka 10-minutilise töötamise läbinud proovide säilitamisel tuvastatud muudatused tagasihoidlikeks. 1,5% lahuse puhul on läbimõõt kasvanud 140,9 nm-lt 157,5 nm-le (suurenemine 11,8%), 2,5% lahuses 155,6 nm-lt 157,7 nm-le (suurenemine 1,35%) ja 3,5% lahuses 153,8 nm-lt 155,7 nm-le (suurenemine 1,20%). Statistiliselt osutus oluliseks 1,5% lahuses toimunud muutus ( $p=0,007$ ) ning 2,5% ja 3,5% lahustes tuvastatud muutused osutusid statistiliselt ebaolulisteks ( $p$ -väärtused vastavalt 0,161 ja 0,187). Hinnates aga osakeste

suurusi kontsentratsioonist sõltumata leiti, et osakesed on stabiilsed ning nädalane hoiustamine läbimõõtudele mõju ei avaldanud ( $p > 0,05$ ).

Katseseeria tulemusel võib järeldada, et vähemalt viieminutilise ultrahelitöötuse abil tekitatud liposoomid on stabiilse struktuuriga, sest külmkapis ( $4...6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) nädala jooksul säilitatud proovide liposoomide hüdrodünaamiline läbimõõt märkimisväärselt ei muutunud.

### 3.5. Ultrahelitöötuse kestuse mõju hindamine osakeste suurusele

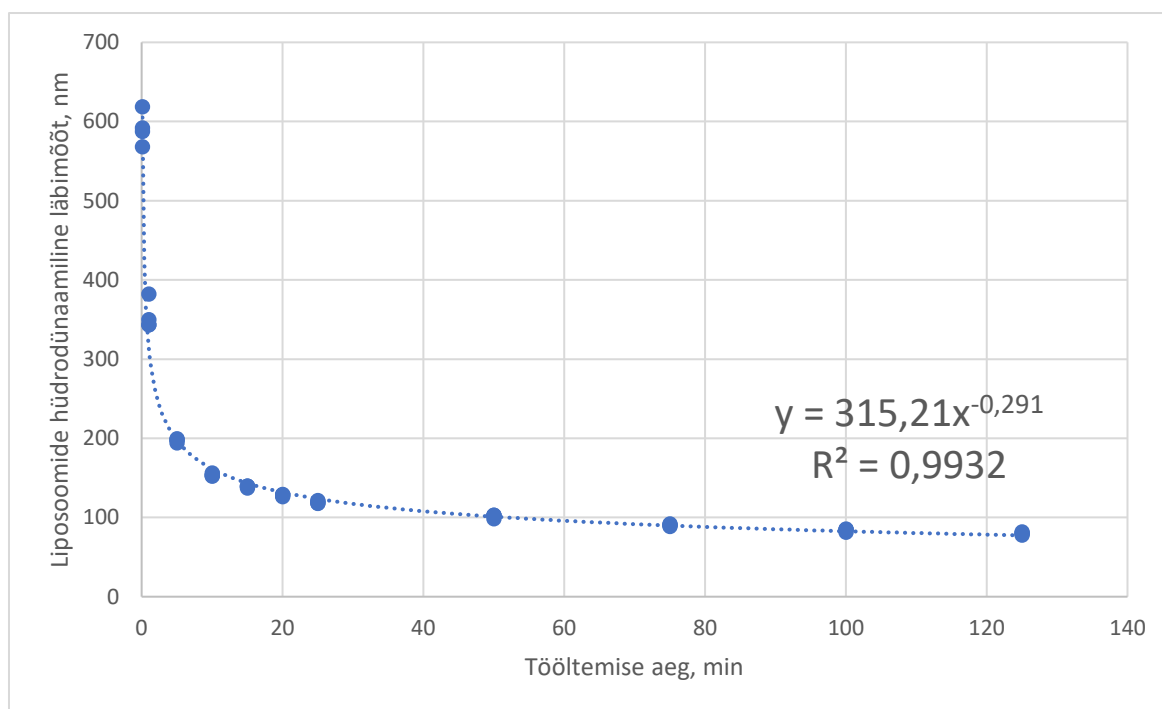
Viies katsete seeria viidi läbi selgitamiseks välja, kui suur mõju on ultrahelitöötuse kestusel liposoomide suurusele. Selle katse läbiviimiseks kasutati kolmanda katseseeria käigus 10-minutilise töötuse läbinud lahust kontsentratsiooniga 3,5%.

Antud lahust töödeldi kõigepealt ultraheliga täiendavalt 15 minutit, võttes proovid iga viie minuti möödudes. Seejärel jätkati sama lahuse töötlemist 100 minuti jooksul võttes proovid iga 25 minuti möödudes. Proove analüüsiti seadmega *Zetasizer* ning korduvmõõtmiste keskmised tulemused on kantud tabelisse 3.6.

**Tabel 3.6.** Liposoomide suuruste muutus 125-minutilise töötuse jooksul

Proovi nimetus	Kontsentratsioon, %	Ultrahelitöötuse aeg, min	Z-Average, nm
3-C3,5/0	3,5	0	591,6
3-C3,5/1	3,5	1	354,7
3-C3,5/5	3,5	5	197,6
3-C3,5/10	3,5	10	153,8
5-3C3,5/10+5	3,5	15	139,1
5-3C3,5/10+10	3,5	20	128,2
5-3C3,5/10+15	3,5	25	119,6
6-3C3,5/25+25	3,5	50	101,7
6-3C3,5/25+50	3,5	75	90,58
6-3C3,5/25+75	3,5	100	84,19
6-3C3,5/25+100	3,5	125	79,98

Saadud tulemuste alusel on koostatud graafik iseloomustamaks osakeste suuruse vähenemist sõltuvalt töötuse kestusest. Graafiku koostamiseks on kasutatud kõigi nelja korduvmõõtmise tulemusi. Saadud graafik on esitatud joonisel 3.5.



**Joonis 3.5.** Liposoomide hüdrodünaamilise läbimõõdu vähenemine 125-minutilise töötamise jooksul.

Mõõtetulemuste põhjal on leitud neid aproksimeeriv funktsioon ning kujutatud seda esitav trendijoon. Valitud funktsioon iseloomustab liposoomide läbimõõdu vähenemist saadud tulemuste lõikes 99,32% täpsusega. Funktsiooni abil on võimalik määrata kindlaks töötamise kestuse aeg, mis on vajalik soovitud suurusega liposoomide valmistamiseks.

Funktsiooni abil on välja arvatud, et kui töötlemata lahuses on liposoomide keskmine hüdrodünaamiline läbimõõt 591,6 nm, siis saavutamaks osakeste keskmist hüdrodünaamilist läbimõõtu 200 nm tuleb lahust töödelda ultraheliga 4 min ja 46 sek, saavutamaks liposoomide keskmist hüdrodünaamilist läbimõõtu 100 nm tuleb lahust töödelda 51 min ja 41 sek. 125-minutilise töötlemise lõpuks on liposoomide keskmine hüdrodünaamiline läbimõõt 79,98 nm. Graafikul mittekajastava läbimõõdu saavutamiseks on funktsiooni abil võimalik välja arvutada vajaliku töötamise kestus. Soovides saavutada keskmiseks läbimõõduks 60 nm on funktsiooni abil arvatud töötlemise aja kestuseks 299 min ja 4 sek.

Erineva läbimõõduga liposoomide valmistamiseks kuluva aja analüüsimisel nähtub, et teatud hetkest liposoomide hüdrodünaamilise läbimõõdu vähenemise kiirus aeglustub. 100 nm piiri ületamiseks tuleb lahust töödelda 52 min, aga jõudmaks läbimõõduni 80 nm tuleb lahust täiendavalt töödelda veel 74 minutit ning jõudmaks 100 nm läbimõõdust 60 nm läbimõõduni tuleks lahust töödelda täiendavalt 247 minutit. Seega täiendava 20%-se läbimõõdu vähendamiseks tuleb täiendavalt lisada 142% juba kulutatud energiast ning 40%-se läbimõõdu vähendamiseks tuleb täiendavalt lisada 475% juba kulutatud energiast.

Leidmaks võimalusi energiakulude vähendamiseks ning soovitud tulemuse kiiremaks saavutamiseks on käesoleva töö abil võimalik jõuda tulemuseni, kus täiendavate katsetuste läbiviimiseks ei tule soetada uusi, kindla ultraheli väljundsignaaliga, seadmeid, vaid on võimalik olemasoleva mahuti küljes paiknev piesoelement välja vahetada ning väljatöötatud katseskeemi abil rakendada sellele sobival resonantssagedusel toitepinget. Väljatöötatud juhtimisskeemi toimimine on katseliselt tõestatud ning see annab võimaluse jätkata uurimustega erinevatel sagedustel ning jätkata optimaalse liposoomide valmistamisrežiimi kindlakstegemist ultrahelitöötuse teel, sõltuvalt soovitud liposoomide läbimõõdu saavutamise vajadusest. Lisaks võimaldab koostatud juhtimisskeem luua eeldused ka erinevate energiakadude arvestamiseks. Lisaks ülekandekadudele eraldub piesoelemendilt osa kulunud energiast ümbritsevasse keskkonda soojusenergia näol, osa kulub seadme mahuti soojendamiseks, osa mahutis oleva vedeliku soojendamiseks ning teatud osa jõuab uuritavas vedelikku, mis osaleb liposoomide valmistamisprotsessis vahetult. Nende tulemuste väljaselgitamiseks tuleb aga jätkata uuringuid.

Käesoleva analüüsi tulemusel leitud liposoomide läbimõõdu vähenemist kirjeldav funktsioon on sarnane ka kirjandusest leitud ja peatükis 1.3. esitatud analoogselt läbiviidud katse [12] tulemusel saadud kirjeldusele ning see annab põhjuse järeldusteks, et töö käigus läbiviidud katsete abil saadud tulemused on usaldusväärsed ning valitud seadme abil on võimalik saavutada soovitud eesmärk ning jätkata edasiste uuringutega.

### 3.6. Võimsuse mõõtmise katse ja energiakulu arvestus

Vattmeetriga läbiviidud piesoelemendi võimsuse mõõtmise katse käigus mõõdetud võimsuse abil on viieminutilise lahuse töötuse elektrienergia kulu arvutatav valemi 3.1. abil järgnevalt.

$$E_1 = P_1 \cdot t \quad (3.1.)$$

kus  $P_1$  on vattmeetriga mõõdetud seadme võimsus, 32 W;

$t$  – seadme töötamise aeg, 300 s.

Seega,

$$E_1 = 32 \cdot 300 = 9600 \text{ W}\cdot\text{s}$$

Viieminutilise töötuse energiakulu on lihtsustatud arvutuse kohaselt 9600 W·s.

Saadud tulemuse kontrollimiseks on tehtud arvutused ka ostsilloskoobiga salvestatud mõõtmistulemuste abil. Salvestatud andmetest on esimesed kümme ja viimased kümme mõõtetulemust esitatud tabelis 3.7. Pingete mõõtmised on läbiviidud seadme originaalskeemi abil, kus piesoelemendile jõuab vahelduvpinge ja sellest tulenevalt on mõõdistatud pingeväärtused tabelis ka negatiivse väärtusega.

**Tabel 3.7.** Väljavõte ostsilloskoobiga mõõdetud pingeväärtustest

		<i>OSC CH1</i>	<i>OSC CH2</i>
	<b>Aeg, <math>\mu</math>s</b>	<b>Pinge, mV</b>	<b>Pinge, mV</b>
1	0,100	-42000	-1040
2	0,200	-42000	-1040
3	0,300	-42000	-1000
4	0,400	-44400	-1040
5	0,500	-44400	-1040
6	0,600	-44800	-1040
7	0,700	-44800	-1040
8	0,800	-47200	-1040
9	0,900	-47200	-1040
10	1,000	-47600	-1000
...	...	...	...
...	...	...	...
...	...	...	...
3031	303,100	-24400	-1080
3032	303,200	-27200	-1120
3033	303,300	-27200	-1120
3034	303,400	-27600	-1120
3035	303,500	-27600	-1120
3036	303,600	-28800	-1240
3037	303,700	-28800	-1240
3038	303,800	-29200	-1240
3039	303,900	-29200	-1240
3040	304,000	-30000	-1800

Andmete salvestamise intervall on 0,1  $\mu$ s ning ostsilloskoop salvestas ühe mõõtmise jooksul 3040 andmerida. Ostsilloskoobi poolt salvestatud andmed on mõõdetud millivoltides mõlema kanali korral. Teise kanali puhul oli katse käigus ostsilloskoobi mõõtejuhtmel sätestatud ülekandeteguriks kümme ja seega on teise kanali poolt salvestatud väärtused kümme korda väiksemad kui tegelikult mõõdetud väärtused.

Arvutusteks on seetõttu kõigepealt teise kanali tulemused korrutatud läbi kümnegga. Seejärel oli võimalik teise kanali tulemuste ehk takistil tekkinud pingelangu abil arvutada ahela voolutugevuse hetkväärtused kasutades selleks valemit 3.2, teades selleks vooluringi paigaldatud takisti nimiväärtust.



$$I = \frac{U}{R} \quad (3.2.)$$

kus  $I$  on voolutugevuse hetkväärtus;

$U$  – takistil mõõdetud pingelangu hetkväärtus;

$R$  – ahelasse ühendatud takisti nimiväärtus,  $7\Omega$ .

Mõõdetud suurused tabelis on millivoltides ja seega saadud tulemused on leitud milliamprites. Teades ahelas tekkinud voolutugevuse väärtusi on võimalik arvutada seadme võimsus igal mõõtmise toimumise ajahetkel. Selleks on kasutatud valemit 3.3.

$$P_2 = U \cdot I \quad (3.3.)$$

kus  $P_2$  on arvutuslik piesoelemendi hetkeline võimsus;

$U$  – piesoelemendil mõõdetud pingelangu hetkväärtus;

$I$  – arvutuslik voolutugevuse hetkväärtus.

Võttes arvesse, et mõõdetud pingete hetkväärtused tabelis esinesid ka negatiivsete arväärtustena, tekkisid arvutuslikult ka negatiivsed hetkvõimsused, sest piesoelemendile jõudev vahelduvpinge saab siinuselise kuju tõttu omada negatiivse poolperioodi jooksul ka negatiivset hetkväärtust, tuli kõikidest arvutuslikult leitud võimsustest leida nende absoluutväärtus, sest võimsusel ei saa olla negatiivset väärtust.

Hetkvõimsuste summeerimisel saadud tulemus iseloomustab ostsilloskoobi mõõtmise sooritamise jooksul ehk 304  $\mu$ s jooksul fikseeritud hetkvõimsuste summat. Saadud tulemuse abil energiakulu leidmiseks ühe sekundi jooksul on kasutatud valemit 3.4.

$$E_s = \frac{1}{t_m \cdot 0,000001} \cdot \Sigma P \quad (3.4.)$$

Kus  $E_s$  on elektrienergia kulu ühe sekundi jooksul;

$t_m$  – mõõtmise summaarne aeg, 304  $\mu$ s;

$\Sigma P$  – arvutuslikult leitud mõõtmise summaarne võimsus.

Seega,

$$E_s = \frac{1}{304 \cdot 0,000001} \cdot 0,009558 = 31,4405 \text{ W}\cdot\text{s}$$

Leidmaks viieminutilise töötlemise energiakulu on saadud tulemuse põhjal leitud vastav energiahulk valemi 1.5. abil.

$$E_2 = E_s \cdot t \quad (3.5.)$$

kus  $E_2$  on elektrienergia kulu;

$E_s$  – energiakulu sekundis, 31,4405 W·s;

$t$  – töötlemise aeg, 300 s.

Seega,

$$E_2 = 31,4405 \cdot 300 = 9432,1466 \text{ W}\cdot\text{s}$$

Viieminutilise töötamise elektrienergia kulu vattmeetri abil tuvastatud piesoelemendi võimsuse (32 W) korral on 9600 W·s ja pingete mõõtmise kaudu arvutuslikult leitud piesoelemendi võimsuse (31,44 W) korral 9432 W·s. Saadud tulemused on üsna lähedased ja seega võib arvata, et ka vattmeetriga tuvastatud elemendi võimsus on üsna tõene.

Ultrahelitöötamise kestuse mõju uurimise katse läbiviimisel töödeldi lahust 125-minutilise ajaperioodi jooksul. Antud katse energiakulu on arvutatud samuti valemi 3.5. abil, kus töötlemise ajaks on arvestatud 7500 sekundit. Töötlemise käigus kulunud elektrienergia kogu 125-minutilise katseperioodi jooksul on arvutuslikult 65,5 W·h.

Teostatud mõõtmised ja energiakulu arvutused võimaldavad väita, et toote pakendil kuvatud rida, kus on märgitud ultrahelisignaali võimsuseks 35 W, ei märgi mitte ultrahelisignaali võimsust vaid selle asemel on mõeldud piesoelemendile jõudva elektrilise võimsuse suurust.

## KOKKUVÕTE

Käesolev magistritöö annab põgusa ülevaate liposoomide tekkemehhanismidest ning valmistamismeetoditest. Põhjalikumalt käsitletakse käesoleva töö fookuses olevat ultrahelimeetodit – lahuse kaudne töötlemine. Töös kirjeldatakse ultrahelitöötamise erinevaid rakendamise võimalusi, selleks vajalikke komponente ning olulisi parameetreid selle efektiivsemaks kasutamiseks. Samuti analüüsitakse töötlemise tulemusel tekkivaid muutusi lahuses esinevate liposoomide suuruses.

Töö tulemusel on edukalt koostatud olemasoleva, ultrahelil põhineva puhastusseadme töö juhtimiseks väline, seadme enda elektroonikaskeemist sõltumatu juhtimisskeem ning leitud selle teostamiseks sobilik tehniline lahendus. Seadme juhtimise tööks vajalikud komponendid on valitud ja kirjeldatud selliselt, et oleks võimalik analoogse seadme konstrueerimine. Juhtimisskeemi töö kontrollimiseks ning ultrahelitöötamise mõju hindamiseks läbi viidud erinevad katsed on andnud kinnitust pakutava lahenduse funktsionaalsusest.

Lisaks toimivale ultrahelitöötamise rakendamiseks vajalikule tehnilise lahenduse välja-töötamisele on uuritud ultrahelitöötamise mõju liposoomide suurusle ja tekkimise dünaamikale fosfolipiidses lahuses. Liposoomide läbimõõdu suure varieeruvuse tõttu on vaadeldud muudatusi kahel erineval skaalal. Mikromeetri skaalal on vaadeldud lahuses esinevaid ühest mikromeetrist suuremaid liposoomide ning nanomeetri skaalal ühest mikromeetrist väiksemaid liposoomide. Ultrahelitöötamise tulemusel tekkivaid olulisi muudatusi liposoomide suuruses on täheldatud mõlemal skaalal. Seetõttu on järeldatud, et valitud seadme abil on kaudse meetodi rakendamine olnud edukas.

Liposoomide suurusle avaldavad mõju nii ultraheli sagedus ja amplituud kui ka ultrahelitöötamise ajaline kestus. Töötlemise ajalise kestuse uurimise tulemusel on koostatud töötamise mõju kirjeldav funktsioon, mis võimaldab hinnata soovitud suurusle liposoomide valmistamiseks vajalikku aja- ning energiakulu.

Lisaks eelpool mainitud olulistele faktoritele on töö käigus uuritud ka erinevate fosfolipiidsede lahuste kontsentratsiooni mõju liposoomide suurusle ning tekkimise dünaamikale. Katsete läbiviimise tulemusena on selgunud, et liiga suure kontsentratsiooniga fosfolipiidses lahuses

tihedus võib muutuda liiga suureks ning ultrahelitöötlus ei pruugi liposoomide suurusele mõju avaldada. Seega on jõutud järeldusele, et suure kontsentratsiooniga lahuse kasutamist tuleks vältida.

Uurimaks ultrahelitöötluse läbinud lahuse säilitamise võimalikkust hilisemaks kasutamiseks on käesolevas töös sooritatud liposoomide analüüs sama lahusega vahetult peale töötlemist ning nädalase külmkapis hoiustamise järel. Analüüsi tulemusel leidis kinnitust ultrahelitöötluse läbinud lahuses saavutatud liposoomide stabiilne struktuur ning hoiustamise järel liposoomide suuruses muudatusi ei täheldatud. Selle tulemusel on jõutud järeldusele, et ultraheliga töödeldud lahus on hoiustatav külmkapis vähemalt nädalase perioodi jooksul.

Töö käigus analüüsiti ka ultrahelisignaali sagedusel mahuti vibreerimist põhjustava piesoelemendi toimimist. Analüüsi tulemusel selgus, et piesokeraamilisest materjalist valmistatud elementidel on kindel omavõnkesagedus ja ultrahelisignaali sagedust mõjutavad piesokeraamilise elemendi geomeetrilised parameetrid. Seeläbi jõuti tulemusele, et oluliselt erineva sageduse rakendamiseks tuleks leida meetod mahuti küljes asuva piesoelemendi asendamiseks. Käesolevas töös välja töötatud juhtimisskeemi abil on võimalik rakendada piesoelemendi tööks vajalikku toitesignaali sõltumata kasutatavast elemendist ning vajalikust sagedusest. Lisaks loob antud skeem suurepärase eeldused edaspidisteks temaatikaga seotud uuringuteks.

Energiakulu mõõtmiseks välja töötatud meetodika võimaldab hõlpsasti mõõta ka alternatiivse ultrahelisignaali allikaga läbiviidavaid katseid ning seeläbi arvestada täpselt ka liposoomide valmistamise energiakulu. Käesolevas töös keskenduti energiakulu arvestamiseks vajaliku tehnilise lahenduse väljatöötamisele ega arvestatud erinevate energiakadude osakaalu liposoomide valmistamise protsessis. Seeläbi on loodud eeldused tulevikus läbiviidavateks täiendavateks uurimisteks, katseteks ja täpsemateks analüüsideks, mis võimaldaksid leida lisaks energiakulule töötlemise käigus esinevaid energiakadusid.

## KIRJANDUS

- [1] **Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Woo Joo, S., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K.** (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. – *Nanoscale Research Letters* 2013. 8:102.
- [2] **Pradhan, B., Kumar, N., Saha, S., Roy, A.** (2015). Liposome: method of preparation, advantages, evaluation and its application. – *Journal of Applied Pharmaceutical Research*. Volume 3 Issue 3. lk 1-8.
- [3] **Olkonen, A.** (2001). Piimanduse käsiraamat. Tartu. Greif. 667 lk.
- [4] **Thompson, E. T.** (2018) Lipid. *Encyclopædia Britannica*. [veebileht] <https://www.britannica.com/science/lipid> (23.05.2019).
- [5] **Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J.** (2002) Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. The Lipid Bilayer. [veebileht] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871/> (23.05.2019).
- [6] **Poikalainen, V., Tatar, V., Laikoja, K., Traksmäa, A., Laos, K., Lepasalu, L., Soidla, R., Andreson, H., Veri, K., Mahla, T.** (2018). Toiduainete tehnoloogia. Tartu. Audiomeister OÜ. 732 lk.
- [7] **Patil, Y. P., Jadhav, S.** (2014). Novel methods for liposome preparation – *Chemistry and Physics of Lipids* 177. lk 8-18.
- [8] **Chrai, S. S., Murari, R., Ahmad, I.** (2002) Liposomes: A Review. Part I: Manufacturing Issues. – *Pharmaceutical Technology*. lk 28-34.
- [9] **Minisini, K.** (2016) Development of thermoresponsive liposomes as a delivery system of HRP. [veebileht] <https://infoscience.epfl.ch/record/220891/files/Master%20thesis%20Katlyn%20Minisini.pdf> (23.05.2019)
- [10] **Richardson, S. E., Pitt, G. W., Woodbury, J. D.** (2007). The Role of Cavitation in Liposome Formation. – *Biophysical Journal* Volume 93 December 2007. lk 4100–4107.
- [11] Extrusion for unilamellar liposome formation. (2016). [veebileht] [https://www.manufacturingchemist.com/news/article\\_page/Extrusion\\_for\\_unilamellar\\_liposome\\_formation/123448](https://www.manufacturingchemist.com/news/article_page/Extrusion_for_unilamellar_liposome_formation/123448) (23.05.2019)

- [12] **Yamaguchi, T., Nomura, M., Matsuoka, T., Koda, S.** (2009). Effects of frequency and power of ultrasound on the size reduction of liposome. – *Chemistry and Physics of Lipids* 160. lk 58–62.
- [13] **Silva, R., Ferreira, H., Little, C., Cavaco-Paulo, A.** (2010). Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation. – *Ultrasonics Sonochemistry* 17. lk 628-632.
- [14] **Taladrid, D., Marín, D., Alemán, A., Álvarez-Acer, o I., Montero, M.C., Gómez-Guillén, P.** (2017). Effect of chemical composition and sonication procedure on properties of food-grade soy lecithin liposomes with added glycerol. – *Food Research International* 100. lk 541-550.
- [15] **Li, M., Du, C., Guo, N., Teng, Y., Meng, X., Sun, H., Li, S., Yu, P., Galons, H.** (2019). Composition design and medical application of liposomes. – *European Journal of Medicinal Chemistry* 164. lk 640-653.
- [16] **Marsanasco, M., Chiaramoni, N. S., Alonso, S. V.** (2017). Liposomes as Matrices to Hold Bioactive Compounds for Drinkable Foods: Their Ability to Improve Health and Future Prospects. – *Functional Food. Improve Health through Adequate Food*. IntechOpen. lk 185-208.
- [17] **Tran, V. V., Moon, J-Y., Lee, Y-C.** (2019). Liposomes for delivery of antioxidants in cosmeceuticals: Challenges and development strategies. – *Journal of Controlled Release Volume* 300. lk 114-140.
- [18] Piezoelectric Ceramics Vol. 01 (2017) [veebileht] [http://www.mmech.com/images/stories/Standard\\_Products/Tokin/Tokin\\_Links/piezoelectric-ceramics--Vol1-new.pdf](http://www.mmech.com/images/stories/Standard_Products/Tokin/Tokin_Links/piezoelectric-ceramics--Vol1-new.pdf)
- [19] **Abo, L.** (2007) Koduelektroonika käsiraamat. Kirjastanud autor. 352 lk.
- [20] **Pedusaar, H.** (1982) Helitehnika kodus. Tallinn. Valgus. 216 lk.
- [21] Ultrahelipesur 600ml. [veebileht] <https://www.tooriistamarket.ee/et/ultrahelipesur-600ml> (23.05.2019)
- [22] DDS funktisioonigeneraator PeakTech 4045 [veebileht] <https://www.peaktech.de/productdetail/kategorie/dds-funktionsgeneratoren/produkt/p-4045.html> (23.05.2019)
- [23] Malvern Mastersizer 3000. [veebileht] [https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/mastersizer-range/mastersizer-3000?creative=349161133861&keyword=malvern%20mastersizer&matchtype=p&network=g&device=c&gclid=CjwKCAjw\\_YPnBRBREiwAIP6TJ3QMPVmuL9vPVHAjcSHEKg2fxU4Ie9sqwHrw3dzFBd6EbAoLDAjRSBoCR34QAvD\\_BwE](https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/mastersizer-range/mastersizer-3000?creative=349161133861&keyword=malvern%20mastersizer&matchtype=p&network=g&device=c&gclid=CjwKCAjw_YPnBRBREiwAIP6TJ3QMPVmuL9vPVHAjcSHEKg2fxU4Ie9sqwHrw3dzFBd6EbAoLDAjRSBoCR34QAvD_BwE) (23.05.2019)

- [24] Malvern Zetasizer Nano ZS [veebileht] <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs/index.html> (23.05.2019)
- [25] Hüpoteeside statistiline kontrollimine (veebileht) <http://www-1.ms.ut.ee/mart/biomeetria2010/Hypoteesid.pdf> (25.05.2019)

# LIHTLITSENTS

**Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendajate kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta**

Mina, Siim Muiste,  
sünniaeg 18.03.1985

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda koostatud lõputöö

**Ultraheli meetodil liposoomse mikrokapsuleerimise seadme tehniline lahendus,**

mille juhendajad on Eugen Kokin ja Andres Sats

- 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
- 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
- 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

- 2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
- 3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor \_\_\_\_\_  
(allkiri)

Tartu, \_\_\_\_\_  
(kuupäev)

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

\_\_\_\_\_  
(juhendaja nimi ja allkiri) (kuupäev)

\_\_\_\_\_  
(juhendaja nimi ja allkiri) (kuupäev)